



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR
Ciências

EXTRACÇÃO, PURIFICAÇÃO E DETERMINAÇÃO DA ACTIVIDADE ANTIOXIDANTE DE COMPOSTOS FENÓLICOS DA ESPÉCIE *PRUNUS AVIUM*

Sofia Morão dos Santos

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Química Industrial
(2º ciclo de estudos)

Orientador: Prof. Doutor José Albertino Almeida de Figueiredo

Covilhã, Junho de 2011

Apreendi que quanto mais corremos atrás
dos nossos sonhos, mais vontade sentimos
de conseguir conciliar a aprendizagem,
o sucesso e a essência da vida com
as pessoas que amamos.

Em especial aos meus **Pais e Irmã**

AGRADECIMENTOS

No percurso de estudo e trabalho que agora termina participaram, directa ou indirectamente, várias pessoas e instituições que merecem o meu sincero reconhecimento e gratidão, sem as quais não seria possível a conclusão desta dissertação.

O meu reconhecido agradecimento ao Professor Doutor José Albertino Almeida de Figueiredo, do Departamento de Química da Universidade da Beira Interior, pela sua dedicada orientação e atenção, pelo constante apoio, pela disponibilidade e compreensão, pelas sábias correções e pelos conhecimentos científicos transmitidos, sendo uma peça fundamental na concretização desta dissertação.

Agradeço à Professora Doutora Maria Isabel Guerreiro da Costa Ismael, Presidente do Departamento de Química da Universidade da Beira Interior, o precioso apoio, disponibilidade e toda a sua boa disposição até nas situações mais complicadas deste trabalho.

Ao Professor Doutor Armando Jorge Domingues Silvestre, do Departamento de Química da Universidade de Aveiro, agradeço a disponibilidade e ajuda prestada na realização das análises de GC-MS dos extractos estudados.

Agradeço à Professora Doutora Ana Maria Carreira Lopes, Presidente da Faculdade de Ciências da Universidade da Beira Interior, pela preocupação e ajuda constante.

Ao Professor Doutor Rogério Manuel dos Santos Simões, do Departamento de Química da Universidade da Beira Interior, agradeço a colaboração, ajuda e disponibilidade prestada para a realização dos testes de actividade antioxidante.

Agradeço ao Departamento de Química da Universidade de Aveiro, bem como ao Sr. Luís António Ferreira Matias, do Departamento de Química da Universidade da Beira Interior, pela colaboração prestada na realização dos espectros de RMN.

Agradeço também à Universidade da Beira Interior todas as facilidades concedidas na realização deste trabalho.

Quero ainda aqui expressar um agradecimento à Unidade de Materiais Têxteis e Papeleiro do Departamento de Química da Universidade da Beira Interior, que permitiu a realização deste trabalho de investigação, através do financiamento concedido pela Bolsa de Investigação.

Agradeço aos meus amigos que sempre me apoiaram em todos os passos desta caminhada, pelos sorrisos e alegrias trocadas, e principalmente pela grande amizade que sempre me ofereceram.

Finalmente, e muito especialmente, quero agradecer aos meus pais e irmã, pela compreensão e palavras de incentivo, por toda a motivação e carinho que foram indispensáveis para concretizar este grande objectivo da minha vida. Sem vocês não seria possível. Muito obrigado por serem sempre uma família maravilhosa.

A todos os que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, aqui fica o meu agradecimento.

Sofia Morão dos Santos

RESUMO

O objectivo deste trabalho foi a extracção, isolamento e purificação de compostos fenólicos existentes na cerejeira (*Prunus avium*), bem como a determinação da actividade antioxidante dos extractos e compostos puros.

A madeira é um dos principais materiais utilizados pela humanidade possuindo várias aplicações, sendo também matéria-prima para múltiplos produtos. Em particular, a madeira de cerejeira possui uma elevada importância económica, pois apresenta diversas características importantes, tendo na sua constituição diversos compostos com interesse biológico.

Foi realizado o estudo do extracto da madeira de cerejeira com acetona, previamente extraída por extracção de Soxhlet, realizando-se o isolamento e purificação por cromatografia em coluna, para identificação dos produtos puros obtidos. A caracterização estrutural foi efectuada por espectroscopia de ressonância magnética nuclear de protão (^1H -RMN) e de carbono (^{13}C -RMN) permitindo confirmar a existência de compostos fenólicos nos extractos analisados. As estruturas dos compostos identificados foram então comparadas com as estruturas propostas pelo grupo de trabalho, bem como as estruturas já descritas na literatura.

Foi realizada a determinação da actividade antioxidante dos extractos da casca da madeira, dos pés de cereja, das folhas e da madeira de cerejeira, bem como do composto catequina isolada a partir do extracto da madeira de cerejeira, utilizando o método do radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazilo), baseado na capacidade que este radical tem em reagir com doadores de hidrogénio para conhecimento da sua actividade antioxidante, utilizando como referência o antioxidante comercialmente conhecido como Quercetina.

Palavras-chave: *Prunus avium*, compostos fenólicos, flavonóides, actividade antioxidante e radical DPPH.

ABSTRACT

The main objective of this work was the extraction, isolation and purification of phenolic compounds existing in cherry (*Prunus avium*), and the determination of antioxidant activity of extracts and pure compounds.

Wood is one of the main materials used by humanity featuring multiple applications, and raw material for multiple products. In particular, the cherry wood has a high economic importance, because it introduces several important features and possesses several biological compounds with interest.

Study of extract with acetone of wood of cherry tree, previously extracted with Soxhlet extractor, was made by column chromatography and was isolated and purified several products, which were identified. Structural characterization was undertaken by nuclear magnetic resonance spectroscopy of proton (^1H -NMR) and carbon (^{13}C -NMR) allowing confirming the existence of phenolic compounds in the extracts analyzed. The structures identified were then compared to those already described in literature.

Determination of antioxidant activity of the extracts from the wood bark, the feet of cherry, leaves and wood of cherry tree, and the compound catechin isolated from the extract of wood of cherry tree, based on the ability of this radical has to react with hydrogen donor for knowledge of their antioxidant activity, using as a reference commercially product known as Quercetin.

Keywords: *Prunus avium*, phenolic compounds, flavonoids, antioxidant activity and DPPH radical.

ÍNDICE GERAL

	Pág.
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABELAS	xiv
ABREVIATURAS	xv
CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO	1
1.1. Plantas Medicinais	2
1.2. Cerejeira e seus constituintes	5
1.3. Compostos fenólicos naturais	7
1.3.1. Biossíntese	9
1.3.2. Extracção	12
1.3.3. Propriedades biológicas	13
1.4. Flavonóides	15
1.4.1. Flavanonas	18
1.4.2. Flavonas	19
1.4.3. Flavonóis	20
1.4.4. Flavanóis	20
1.4.5. Antocianinas	22
1.4.6. Relação estrutura-actividade antioxidante	24
1.5. Determinação da actividade antioxidante	25
1.6. Compostos com actividade antioxidante	27
CAPÍTULO 2 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
2.1. Objectivos	31
2.2. Extracção do material vegetal	32
2.3. Purificação do extracto da madeira de <i>Prunus avium</i>	35
2.4. Análise e identificação dos compostos isolados	39
2.4.1. Considerações gerais	39
2.4.2. Caracterização estrutural de flavanonas	39
2.4.3. Caracterização estrutural de flavonas e isoflavonas	44
2.4.4. Caracterização estrutural de flavanóis	46
2.5. Determinação da actividade antioxidante	48
CAPÍTULO 3 - CONCLUSÕES	54

CAPÍTULO 4 - PARTE EXPERIMENTAL	57
4.1. Generalidades	58
4.2. Preparação do material vegetal	59
4.3. Técnicas experimentais e caracterização dos compostos	59
4.3.1. Extracção do material vegetal	59
4.3.2. Método de isolamento e purificação	60
4.3.3. Caracterização estrutural dos compostos	60
4.3.4. Análise quantitativa da actividade antioxidante	63
BIBLIOGRAFIA	65
ANEXO I - ESPECTROS DE ¹H-RMN, ¹³C-RMN E RMN-2D	70
ANEXO II - REPRESENTAÇÕES GRÁFICAS	81

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1 - Procedimentos gerais para a obtenção de compostos biologicamente	4
Figura 2 - Espécie <i>Prunus avium</i>	5
Figura 3 - Estrutura de alguns flavonóides isolados e identificados a partir da espécie <i>Prunus avium</i>	7
Figura 4 - Biossíntese de compostos fenólicos	11
Figura 5 - Eliminação de radicais livres pelos compostos fenólicos	14
Figura 6 - Estrutura básica de um flavonóide monomérico	15
Figura 7 - Biossíntese dos esqueletos dos vários grupos de flavonóides	17
Figura 8 - Flavanonas	19
Figura 9 - Flavonas	19
Figura 10 - Flavonóis	20
Figura 11 - Flavanóis	21
Figura 12 - Exemplo de uma proantocianidina	22
Figura 13 - Antocianidinas	23
Figura 14 - Relação estrutura/actividade antioxidante dos flavonóides	25
Figura 15 - Reacção de redução do radical DPPH por acção de antioxidantes (AH)	26
Figura 16 - Estruturas de alguns compostos fenólicos com propriedades antioxidantes isolados a partir de diferentes espécies de plantas.	28

Figura 17 - Estruturas de alguns compostos fenólicos do género <i>Prunus</i> com potencial actividade antioxidante	29
Figura 18 - Massas obtidas dos extractos com os diferentes solventes/100g de material vegetal	33
Figura 19 - Organograma do fraccionamento do extracto da madeira de cerejeira com acetona	37
Figura 20 - Quantidade de compostos puros obtidos por 100g de extracto bruto da madeira de cerejeira	38
Figura 21 - Estrutura química dos compostos isolados e purificados da espécie <i>Prunus avium</i> pertencentes ao grupo das flavanonas	40
Figura 22 - Estrutura química dos compostos isolados e purificados da espécie <i>Prunus avium</i> pertencentes ao grupo das flavonas e isoflavonas	45
Figura 23 - Estrutura química da catequina isolada e purificada de <i>Prunus avium</i>	47
Figura 24 - Comportamento cinético das várias amostras estudadas relativamente ao radical DPPH	49
Figura 25 - Percentagem de actividade antioxidante (%AA)	52
Figura 26 - Espectro de ^1H -RMN da Pinostrobina	71
Figura 27 - Espectro de ^{13}C -RMN da Pinostrobina	71
Figura 28 - Espectro de ^1H -RMN da Tectocrisina	72
Figura 29 - Espectro de ^{13}C -RMN da Tectocrisina	72
Figura 30 - Espectro de ^1H -RMN da Dihidrowogonina	73
Figura 31 - Espectro de ^{13}C -RMN da Dihidrowogonina	73
Figura 32 - Espectro de ^1H -RMN da Pinocembrina	74

Figura 33 - Espectro de ^{13}C -RMN da Pinocembrina	74
Figura 34 - Espectro de ^1H -RMN da Sakuranetina	75
Figura 35 - Espectro de ^{13}C -RMN da Sakuranetina	75
Figura 36 - Espectro de ^1H -RMN da Naringenina	76
Figura 37 - Espectro de ^{13}C -RMN da Naringenina	76
Figura 38 - Espectro de ^1H -RMN da Genisteína	77
Figura 39 - Espectro de ^{13}C -RMN da Genisteína	77
Figura 40 - Espectro de ^1H -RMN do Dihidrocanferol	78
Figura 41 - Espectro de ^{13}C -RMN do Dihidrocanferol	78
Figura 42 - Espectro de ^1H -RMN da Catequina	79
Figura 43 - Espectro de RMN-2D da Catequina	79
Figura 44 - Espectro de ^1H -RMN da Prunina	80
Figura 45 - Espectro de ^{13}C -RMN da Prunina	80
Figura 46 - Representação gráfica da percentagem de DPPH remanescente em função das diferentes concentrações testadas do extracto da madeira de cerejeira	82
Figura 47 - Representação gráfica da percentagem de DPPH remanescente em função das diferentes concentrações testadas da Fracção I do extracto da madeira de cerejeira	82
Figura 48 - Representação gráfica da percentagem de DPPH remanescente em função das diferentes concentrações testadas da Fracção II do extracto da madeira de cerejeira	82
Figura 49 - Representação gráfica da percentagem de DPPH remanescente em função das diferentes concentrações testadas da Fracção III extracto da madeira de cerejeira	83

Figura 50 - Representação gráfica da percentagem de DPPH remanescente em função das diferentes concentrações testadas do extracto dos pés de cereja	83
Figura 51 - Representação gráfica da percentagem de DPPH remanescente em função das diferentes concentrações testadas do extracto da casca da madeira de cerejeira	83
Figura 52 - Representação gráfica da percentagem de DPPH remanescente em função das diferentes concentrações testadas do extracto das folhas de cerejeira	84
Figura 53 - Representação gráfica da percentagem de DPPH remanescente em função das diferentes concentrações testadas do extracto a frio com AcOEt da madeira de cerejeira	84
Figura 54 - Representação gráfica da percentagem de DPPH remanescente em função das diferentes concentrações testadas do extracto a frio com Acetona da madeira de cerejeira	84
Figura 55 - Representação gráfica da percentagem de DPPH remanescente em função das diferentes concentrações testadas da catequina	85
Figura 56 - Representação gráfica da percentagem de DPPH remanescente em função das diferentes concentrações testadas da quercetina	85

LISTA DE TABELAS

	Pág.
Tabela 1 - Classificação científica, distribuição e habitat da cerejeira	6
Tabela 2 - Classes de compostos fenólicos existentes nas plantas	8
Tabela 3 - Fontes alimentares de compostos fenólicos	9
Tabela 4 - Desvios químicos (δ em ppm) dos sinais nos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C , bem como a multiplicidade dos sinais (m) e as constantes de acoplamento (J em Hz) para os compostos 1 , 3 e 4	41
Tabela 5 - Desvios químicos (δ em ppm) dos sinais nos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C , bem como a multiplicidade dos sinais (m) e as constantes de acoplamento (J em Hz) para os compostos 5 , 6 , 8 e 10	44
Tabela 6 - Desvios químicos (δ em ppm) dos sinais nos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C , bem como a multiplicidade dos sinais (m) e as constantes de acoplamento (J em Hz) para os compostos 2 e 7	46
Tabela 7 - Valores da quantidade de antioxidante necessário para diminuir em 50% a concentração inicial de DPPH (EC_{50}) de cada amostra estudada	50

ABREVIATURAS

Abs	Absorvência
AcOEt	Acetato de etilo
C.C.	Cromatografia em coluna
c.c.f	Cromatografia em camada fina
C ₃ D ₆ O	Acetona deuterada
CHCl ₃	Clorofórmio
Ciclhex	Ciclo-hexano
δ	Desvio químico expresso em ppm
d	Dupleto
dd	Duplo dupleto
EC ₅₀	Concentração necessária para atingir 50% do efeito máximo
GC-MS	Cromatografia gasosa/Espectrometria de massa
HSQC	Correlação heteronuclear próton-carbono a uma ligação
I.V.	Espectroscopia de infravermelho
<i>J</i>	Constante de acoplamento
m	Multipeto
MeOH	Metanol
R _f	Factor de retenção
¹ H-RMN	Ressonância magnética nuclear de próton
¹³ C-RMN	Ressonância magnética nuclear de carbono
RMN-2D	Ressonância magnética nuclear bidimensional
s	Singuleto
UV	Ultravioleta

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A Química dos Produtos Naturais actua em diversas linhas básicas de pesquisa, como o estudo da composição química de espécies de diversas famílias, o isolamento de substâncias naturais com acção farmacológica ou fisiológica, a elucidação de estruturas de novas moléculas e a síntese e/ou transformações químicas de moléculas com acção fisiológica. Muitos estudos efectuados sobre espécies vegetais, com potencial acção medicinal, são baseados na procura pelo entendimento dos mecanismos de acção e no isolamento dos seus princípios activos.

Através do conhecimento da medicina tradicional que uma determinada planta possui, são efectuados diversos estudos fitofarmacêuticos. Os extractos obtidos são fraccionados até se obterem produtos puros e com actividade biológica. Um dos principais problemas que se enfrenta neste campo, é o facto destes compostos com actividade biológica se encontrarem em pequenas quantidades nas plantas. No entanto, as técnicas espectrofotométricas utilizadas actualmente na elucidação estrutural, são métodos geralmente não destrutivos, que requerem amostras em quantidades muito pequenas, o que, associado às novas metodologias de isolamento e purificação, expandiu em muito a capacidade do químico orgânico em descobrir novas moléculas interessantes, que ocorrem em diminutas quantidades nos organismos vivos. Neste contexto é importante mencionar que as plantas, além do seu uso na medicina popular com finalidades terapêuticas, têm contribuído ao longo dos anos para a obtenção de novos fármacos.

Actualmente, a investigação de novos compostos naturais com actividade antioxidante para substituir os produtos derivados da síntese orgânica, tornam a Química de Produtos Naturais um interessante desafio.

1.1. Plantas Medicinais

Desde a antiguidade mais remota que o conhecimento sobre as plantas tem acompanhado a evolução do Homem. Diversas civilizações desde muito cedo se aperceberam da existência, ao lado das plantas comestíveis, de outras dotadas de maior ou menor toxicidade que, ao serem experimentadas no combate a doenças, revelaram, embora empiricamente, o seu potencial curativo. O conhecimento sobre plantas medicinais simboliza muitas vezes o único recurso terapêutico de muitas comunidades e grupos étnicos. As plantas medicinais têm sido usadas em diversos domínios, incluindo medicina, nutrição, perfumes, cosméticos, bebidas, entre outros.

A Organização Mundial de Saúde (OMS) define planta medicinal como sendo todo e qualquer vegetal que possui, em um ou mais órgãos, substâncias que podem ser utilizadas com fins terapêuticos ou que sejam precursores de fármacos semi-sintéticos (Rates, 2001).

A crescente descoberta de processos de síntese de compostos orgânicos originou o desenvolvimento de inúmeros medicamentos sintéticos. No entanto, a suspeita de toxicidade de alguns medicamentos, bem como as pesquisas crescentes na área de plantas medicinais com descobertas de novos princípios activos, tem suscitado o interesse por produtos naturais, tanto em países desenvolvidos como nos países em desenvolvimento (Stone et al., 2003). Por exemplo, algumas indústrias do sector alimentar, tentam obter compostos naturais que possuem propriedades antioxidantes, responsáveis por retardar o processo de peroxidação de lípidos, que é uma das principais razões para a deterioração no processamento e armazenamento de produtos alimentares (Djeridane et al., 2006). Para além das propriedades antioxidantes, as plantas medicinais também possuem compostos com propriedades antibacterianas, antivirais, antifúngicas e insecticidas (Bakkali et al., 2008).

A pesquisa e o desenvolvimento de novos fármacos a partir de recursos vegetais constitui uma ajuda para os cuidados primários de saúde e um excelente complemento terapêutico, compatível com a medicina clássica. É considerada uma etapa complexa, do ponto de vista da complexidade tecnológica, incluindo uma série de testes necessários para identificar a potencialidade da acção terapêutica da substância, estudo das suas propriedades, verificação de toxicidade aguda e crónica e a determinação da sua dose activa. Posteriormente, o fármaco passa por testes farmacológicos e estudos farmacotécnicos e, finalmente, ensaios clínicos (Balunas, Kinghorn, 2005; Rates, 2001).

Em suma, a investigação e o desenvolvimento de compostos terapêuticos de origem natural é um estudo complexo, pelo que a avaliação experimental de drogas e medicamentos de origem natural é fundamentalmente efectuada por diferentes profissionais especializados em diferentes áreas de conhecimento, para isolar e caracterizar as substâncias existentes nas plantas, que lhes conferem propriedades medicinais (princípio activo) e assim, produzir novos fármacos (Maisuthisakul, Gordon, 2009). As ciências básicas envolvidas são a Química Orgânica, Etnobotânica e Farmacologia, incluindo Toxicologia. A Antropologia, Agronomia e Biotecnologia podem também aqui desempenhar papéis muito importantes (Rates, 2001).

As plantas, ao contrário dos animais, conseguem sintetizar substâncias químicas para o próprio sustento. Estas substâncias químicas são bastante variadas e podem ser divididas em dois grupos, metabolitos primários e secundários. O metabolismo primário envolve uma série de processos fundamentais para a sobrevivência e desenvolvimento da planta, abrangendo nucleótidos, aminoácidos, hidratos de carbono e ácidos orgânicos. Por sua vez, o metabolismo secundário influencia as interações ecológicas entre a planta e o meio ambiente. Este

metabolismo envolve compostos fenólicos, terpenóides e alcalóides, entre outros, sendo estes compostos responsáveis pelos efeitos medicinais ou tóxicos das plantas, que apresentam grande importância farmacológica e ecológica. Embora os fitoquímicos derivados do metabolismo secundário das plantas sejam muitos, os compostos fenólicos têm sido alvo de grande atenção (Modak et al., 2007; Gonçalves, 2006; Ryan et al, 2002; Lobo, Lourenço, 2007).

A obtenção de compostos com princípios activos, derivados do metabolismo secundário das plantas, envolve uma série de processos realizados por diversos profissionais multidisciplinares. Os processos mais importantes e determinantes para obter estes compostos incluem a selecção da planta, preparação dos extractos, e por fim a separação, purificação e identificação dos constituintes químicos. A análise biológica pode ser efectuada aos extractos brutos, como também aos compostos puros obtidos. Uma vez obtidos os compostos biologicamente activos, um dos desafios que se pode propor é a modificação estrutural e a correlação entre a estrutura química e a actividade biológica (Rates, 2001).

A figura 1 ilustra algumas das etapas básicas que podem ser seguidas quando se procura obter as substâncias activas das plantas. O fundamento básico deste procedimento consiste no facto de toda a substância, independentemente da sua proporção na planta, e de ser conhecida ou não, poder ser um princípio activo.

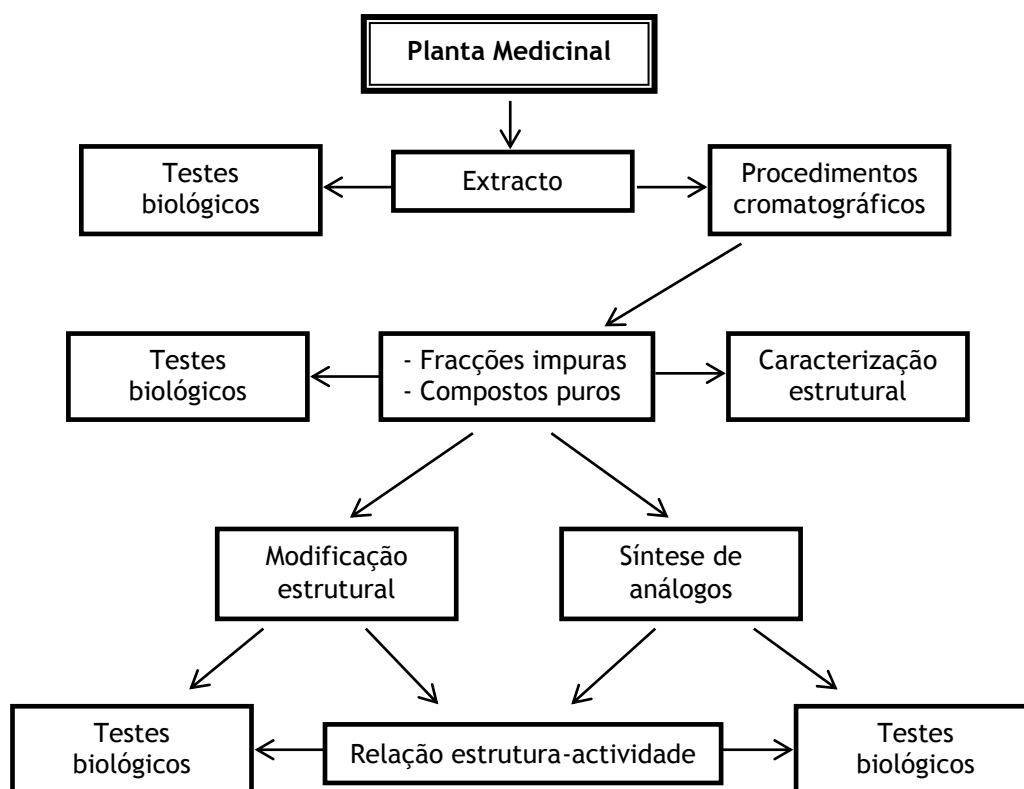


Figura 1 - Procedimentos gerais para a obtenção de compostos biologicamente activos (Adaptado de Rates, 2001).

1.2. Cerejeira e seus constituintes

A cerejeira é uma árvore de folha caduca, que pode atingir 20-25 metros de altura. É uma planta originária da Ásia que foi introduzida na Europa. Em Portugal, localiza-se preferencialmente no Norte e nas montanhas da Beira Interior, sendo cultivada particularmente nos municípios do Fundão, Covilhã e Belmonte, com cerca de 55% da produção nacional (Serra et al., 2010; Gonçalves, 2006). A zona do Douro Sul (Resende, Lamego e Penajóia) e Alfândega da Fé, em Trás-os-Montes, perfazem cerca de 40%. Os restantes 5% distribuem-se por Proença-a-Nova, Ferreira do Zêzere e Portalegre (Gonçalves, 2006).



Figura 2 - Espécie *Prunus avium* (Adaptado de Gonçalves, 2006).

Os frutos da cerejeira, conhecidos como cerejas, são frutos pequenos e arredondados, particularmente atractivos para os consumidores pelos seus atributos cromáticos e aromáticos, bem como pela riqueza em alguns nutrientes com um forte impacto no bem-estar humano. Podem apresentar várias cores, sendo o vermelho a mais comum entre as diversas variedades. A cor é o indicador mais importante da qualidade e maturidade da cereja fresca, e depende do conteúdo em polifenóis: flavonóides, ácido hidrocínâmico e ácido hidrobenczoico (Serra et al., 2010; González-Gómez et al., 2010). O consumo de cerejas pode reduzir a ocorrência de cancro, artrite, inflamação, sintomas induzidos pelo exercício muscular, envelhecimento celular, e oferecer protecção contra doenças neurodegenerativas, sendo por isso importantes na dieta humana. Os efeitos benéficos das cerejas podem ser atribuídos à presença de compostos fenólicos, que exercem uma forte actividade antioxidante (González-Gómez et al., 2010; Faniadis et al., 2010; Gonçalves, 2006).

A madeira da espécie *Prunus avium*, comercializada com o nome de cerejeira, apresenta diversas características importantes, sendo esta madeira bastante dura, forte, flexível e elástica, com aptidão para o uso em mobiliário, instrumentos musicais, portas, janelas, esculturas, carpintaria, entre outros. Esta madeira tem uma importância económica

inestimável dadas as suas aplicações distintas e possui diversos compostos biológicos com interesse (Lopes, 2006).

Os constituintes químicos da espécie *Prunus avium* são diversos, tais como proteínas, cálcio, ferro, fibras, magnésio, sais minerais, potássio, fósforo e vitaminas A, B e C. A cereja é também uma excelente fonte de boro, que contribui para uma boa constituição óssea e pode ainda alterar favoravelmente os níveis das hormonas esteróides. Adicionalmente, a cereja tem um baixo índice glicémico, o que pode constituir uma vantagem relativamente a outros frutos e vegetais (Gonçalves, 2006). As suas propriedades medicinais são bastante valorizadas, actuando como calmante, desinfectante, desintoxicante, diurético, regulador intestinal, antibacteriano, anti-inflamatório, entre muitas outras aplicações (Gonçalves, 2006; Lopes, 2006). A tabela 1 apresenta a classificação científica, a distribuição e o habitat da cerejeira.

Tabela 1- Classificação científica, distribuição e habitat da cerejeira (Adaptado de Gonçalves 2006).

CLASSIFICAÇÃO CIENTÍFICA	
Divisão	Spermatophyta
Subdivisão	Magnoliophytina (Angiospermae)
Classe	Magnoliatae (Dicotyledoneae)
Subclasse	Rosidae
Ordem	Rosales
Família	Rosaceae
Género	<i>Prunus</i>
Espécie	<i>Prunus avium</i>
Nome comum	Cerejeira; Cerdeira; Cerejeira-brava; Cereja (fruto)
DISTRIBUIÇÃO	
	Quase toda a Europa, Oeste da Ásia e Noroeste de África
HABITAT	
	Ruderal e matos

Vários estudos foram desenvolvidos com o objectivo de isolar e caracterizar alguns dos compostos fenólicos presentes na espécie *Prunus avium*, que conferem a esta planta uma grande importância biológica (González-Gómez et al., 2010; Serra et al., 2010; McNulty et al., 2009; Lopes, 2007; Gonçalves, 2006; Vinciguerra et al., 2003). A figura 3 apresenta alguns dos compostos fenólicos da cerejeira que foram isolados, purificados e caracterizados estruturalmente.

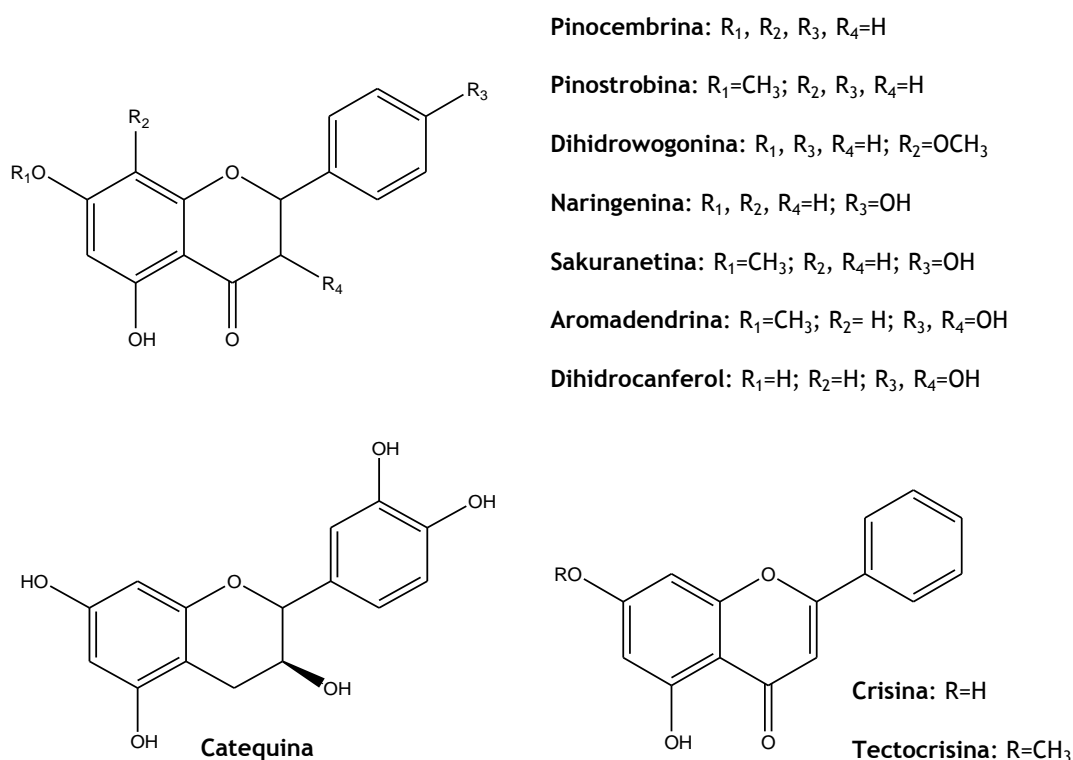


Figura 3 - Estrutura de alguns flavonóides isolados e identificados a partir da espécie *Prunus avium*.

1.3. Compostos fenólicos naturais

A diversidade estrutural de compostos fenólicos deve-se à grande variedade de combinações que acontecem na Natureza e os compostos resultantes são denominados polifenóis, podendo estas combinações fenólicas ser divididas em várias classes. No entanto, possuem em comum na sua estrutura um anel aromático rodeado por um ou mais grupos hidroxilo, e vão desde moléculas fenólicas simples, como os ácidos hidroxibenzóicos, até moléculas com alto grau de polimerização, como os taninos condensados ou hidrolisáveis de elevado peso molecular. O fenol pode ser utilizado como nome-base para designar outros compostos (Gonçalves, 2006; Balasundram et al., 2006). Na sua maioria, os compostos fenólicos são solúveis em água e ocorrem nas plantas na forma livre ou ligados a açúcares (glicósidos) ou proteínas. São componentes substanciais da fracção não energética da dieta humana e também se podem utilizar sob a forma de suplementos nutricionais, juntamente com certas vitaminas e minerais (Gonçalves, 2006).

Os compostos fenólicos estão presentes em várias espécies de plantas e podem ser fenóis simples, ácidos fenólicos (derivados de ácidos benzóico e cinâmico), cumarinas, estilbenos, flavonóides, taninos condensados e hidrolisáveis, lignanos e ligninas, como se pode observar na tabela 2.

Tabela 2 - Classes de compostos fenólicos existentes nas plantas (Adaptado de Balasundram et al., 2006).

CLASSE	ESTRUTURA
Fenóis simples, benzoquinonas	C_6
Ácidos hidroxibenzóicos	C_6-C_1
Acetofenonas, ácidos fenilacéticos	C_6-C_2
Ácidos hidroxicinâmicos, fenilpropanóides (cumarinas, isocumarinas, cromonas, cromenos)	C_6-C_3
Naftoquinonas	C_6-C_4
Xantonas	$C_6-C_1-C_6$
Estilbenos, antraquinonas	$C_6-C_2-C_6$
Flavonóides, isoflavonóides	$C_6-C_3-C_6$
Lignanós	$(C_6-C_3)_2$
Biflavonóides	$(C_6-C_3-C_6)_2$
Ligninas	$(C_6-C_3)_n$
Taninos condensados (proantocianidinas)	$(C_6-C_3-C_6)_n$

Os compostos fenólicos podem ser encontrados em várias partes das plantas como raízes, folhas, caules, cascas, flores e frutos. No entanto, a distribuição destes compostos nos tecidos celulares não é uniforme, isto é, as camadas mais externas das plantas, como a parede celular, contêm níveis mais elevados de compostos fenólicos, contribuindo para a resistência mecânica das paredes celulares, resposta a agentes patogénicos, desempenhando um papel regulador no crescimento e morfogénese da planta.

Actualmente, este grupo de substâncias é de grande interesse, tanto nutricional, pela sua contribuição na manutenção da saúde humana, como do ponto de vista tecnológico. A tabela 3 apresenta as diversas fontes alimentares onde se podem encontrar esta grande diversidade de compostos fenólicos (Balasundram et al., 2006; Naczki, Shahidi, 2006).

Tabela 3 - Fontes alimentares de compostos fenólicos (Adaptado de Nacz, Shahidi, 2006).

COMPOSTOS FENÓLICOS	FONTE
Ácidos fenólicos	
Ácidos hidroxicinâmicos	Damasco, cenoura, cereais, pêra, cereja, frutas cítricas, pêssego, ameixa, espinafre, tomate
Ácidos hidroxibenzóico	Mirtilo, cereais, sementes oleaginosas
Flavonóides	
Antocianidinas	Mirtilo, cereja, uva, framboesa, morango
Chalconas	Maçã
Flavanóis	Maçã, mirtilo, uva, cebola, alface, pêssego
Flavanonóis	Uva
Flavanonas	Frutas cítricas
Flavonóis	Maçã, cereja, feijão, azeitona, cebola, alface
Flavonas	Frutas cítricas, aipo, salsa, espinafre
Isoflavonas	Soja
Taninos	
Condensados	Maçã, uva, pêssego, ameixa, pêra
Hidrolizáveis	Romã, framboesa
Outros compostos fenólicos	
Cumarinas	Cenoura, aipo, frutas cítricas, salsa, nabo
Lignina	Trigo, centeio
Estilbenos	Uva

1.3.1. Biossíntese

Os compostos fenólicos são biossintetizados por meio de diferentes vias, sendo a via do Ácido Xiquímico e a do Acetato-Malonato as duas que mais merecem destaque. A via do Ácido Xiquímico converte precursores de carboidratos, resultantes da glicólise e da via da pentose fosfato, em aminoácidos aromáticos. A biossíntese e a acumulação de compostos secundários das plantas pode ser um processo controlado de forma endógena, durante a diferenciação e o desenvolvimento ou pode ser regulado por factores exógenos, tais como, temperatura e luz (Gonçalves, 2006; Taiz, Zeiger, 2004).

Os aminoácidos aromáticos fenilalanina e tirosina, sintetizados através da via do Ácido Xiquímico, são os precursores chave da maioria dos compostos fenólicos produzidos pelas plantas (figura 4), designadamente, os fenilpropanóides, os ácidos fenolcarboxílicos, os fenóis simples e os flavonóides. Os compostos fenólicos são, de longe, os produtos secundários mais importantes sintetizados pelas plantas, apresentando uma vastíssima gama de estruturas, por vezes de grande complexidade, como é o caso dos taninos, com alguma solubilidade e das ligninas que são completamente insolúveis. Por desaminação não oxidativa, a fenilalanina converte-se em ácido cinâmico e a tirosina em ácido p-cumárico. Estas reacções são promovidas por duas amoníaco-liases: a fenilalanina-amoníaco-liase (PAL) e a tirosina-amoníaco-liase (Gonçalves, 2006; Ryan et al, 2002). A actividade da PAL é aumentada por factores ambientais, tais como baixos níveis de nutrientes, luz e infecção por fungos. A invasão de fungos, por exemplo, desencadeia a transcrição do RNA mensageiro que codifica a PAL, aumentando a sua quantidade na planta, o que, então, estimula a biosíntese de compostos fenólicos (Taiz, Zeiger, 2004).

As reacções subsequentes àquelas catalisadas pela fenilalanina-amoníaco-liase (PAL) e pela tirosina-amoníaco-liase, levam à adição de mais grupos hidroxilo e outros substituintes. Os ácidos cinâmico e p-cumárico e seus derivados são compostos fenólicos simples designados fenilpropanóides, por conter um anel de benzeno e uma cadeia lateral de três carbonos. Os fenilpropanóides são importantes unidades básicas para a formação de compostos fenólicos mais complexos, como os taninos que são muito conhecidos na indústria de alimentos pela sua adstrigência característica (Gonçalves, 2006; Taiz, Zeiger, 2004).

Os flavonóides representam um grupo de compostos fenólicos de grande importância. Estes possuem dois anéis aromáticos que se formam através de duas vias metabólicas diferentes, a via do Ácido Xiquímico e a via do Acetato-Malonato, sendo por isso considerados compostos de biossíntese mista. Deste modo, o anel A é formado a partir de três moléculas de acetato pela via do Acetato-Malonato e o anel B e os átomos de carbono 2, 3 e 4 do heterociclo central, são formados a partir da fenilalanina sintetizada pela via do ácido Xiquímico (Lobo, Lourenço, 2007; Gonçalves, 2006; Taiz, Zeiger, 2004). Estas vias metabólicas são particularmente complexas, com diversos destinos metabólicos, que podem variar consideravelmente consoante os tecidos celulares e em resposta a estímulos ambientais (Ryan et al., 2002).

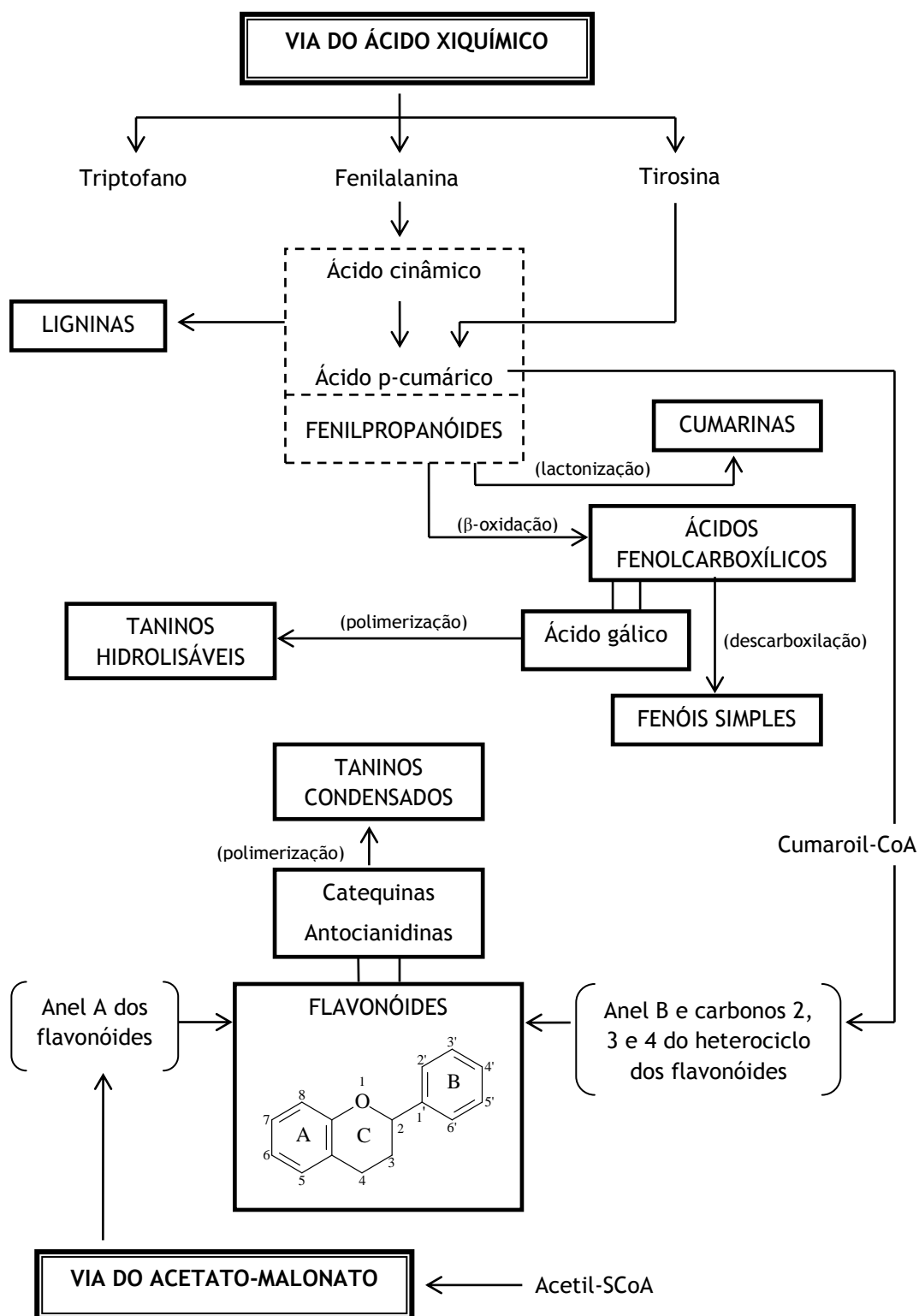


Figura 4 - Biossíntese de compostos fenólicos (Adaptado de Gonçalves, 2006).

1.3.2. Extracção

Existe uma grande diversidade de metodologias para a extracção de substâncias orgânicas a partir de fontes naturais. Dependendo da natureza do material a extrair, algumas técnicas são mais recomendadas que outras. Por exemplo, é possível usar a técnica de destilação por arrastamento de vapor de água na extracção de óleos voláteis, processo muito usado na indústria da perfumaria. Para óleos não voláteis, a extracção contínua com solventes orgânicos de baixo ponto de ebulição (em extractor Soxhlet) é a metodologia mais conveniente. Independentemente da técnica a ser usada na extracção, o processo comum para a obtenção de compostos biologicamente activos a partir de produtos naturais, envolve a escolha da fonte (material biológico, geralmente vegetais), a secagem do material, a trituração, a extracção e a isolamento e purificação dos produtos extraídos (Rates, 2001).

O procedimento mais apropriado para a extracção dos compostos fenólicos depende da natureza da amostra, do seu estado físico e do tipo de fenóis que se pretende extrair. Cada material vegetal tem as suas características únicas em termos de compostos fenólicos. Estes compostos para além de englobarem uma gama enorme de substâncias, são, na maioria das vezes, compostos com grande polaridade, muito reactivos e susceptíveis à acção de enzimas. Assim, é difícil desenvolver um método de extracção óptimo para analisar, quantificar e identificar todos os compostos fenólicos presentes no extracto vegetal. A remoção de substâncias não fenólicas, como açúcares, proteínas e ácidos orgânicos durante a extracção é necessária para aumentar a pureza e quantidade de compostos de natureza fenólica existentes no material vegetal (Naczki, Shahidi, 2006; Rates, 2001).

A extracção de compostos fenólicos com solventes orgânicos é um processo concebido para separar compostos fenólicos solúveis por difusão, utilizando para isso uma matriz sólida (material vegetal) e uma matriz líquida (solvente). A eficiência deste tipo de extracção depende de diversos factores, tais como a natureza do material a ser extraído, natureza e polaridade do solvente, pH, temperatura, tempo de extracção, ligação dos lípidos com outros compostos existentes na planta, circulação do solvente através da amostra, tamanho das partículas da amostra, humidade da amostra, velocidade de refluxo e rácio entre a quantidade de solvente e quantidade de amostra (Naczki, Shahidi, 2006).

Vários solventes têm sido utilizados para a extracção de compostos fenólicos com actividade antioxidante, no entanto, a actividade destes compostos é dependente do solvente utilizado (Chirinos et al., 2007). A solubilidade dos polifenóis varia de acordo com a polaridade do solvente utilizado, o grau de polimerização destes e suas interacções com outros componentes da planta, como hidratos de carbono e proteínas. Os solventes mais utilizados para a extracção de compostos fenólicos são metanol, etanol, acetona, água, acetato de etilo, hexano, propanol, dimetilformaldeído e misturas hidroalcoólicas (Naczki, Shahidi, 2006).

1.3.3. Propriedades biológicas

Apesar de não ser claro quais os compostos mais activos nas plantas medicinais, os compostos fenólicos recebem uma atenção crescente devido às suas actividades biológicas, pois desempenham um papel importante no crescimento e reprodução das plantas, conferindo-lhe elasticidade metabólica, permitindo a mudança de ambientes bióticos a ambientes abióticos e contribuindo para a pigmentação das plantas. São ainda responsáveis por fornecer aos alimentos a cor, sabor, odor, adstringência e estabilidade oxidativa. Os compostos fenólicos exibem uma potencial utilização em alimentos biológicos e funcionais, produtos farmacêuticos e também para destruir a acção de organismos vivos indesejados ou nocivos, tais como fungos, insectos, vírus e bactérias. Têm ainda um papel importante na inibição de enzimas, protecção contra os raios ultravioleta e visível, atracção de polinizadores, entre outros. Como se pode verificar, os compostos fenólicos são responsáveis por inúmeras propriedades importantes e podem ser utilizados em diversas áreas, como por exemplo na indústria alimentícia, cosmética e farmacêutica. A capacidade antioxidante que estes compostos exibem tem recebido cada vez mais atenção, contribuindo para os mais diversos efeitos benéficos para o ser humano (Gonçalves, 2006; Nacz, Shahidi, 2006; Balasundram et al., 2006; Rice-Evans et al., 1997).

Uma das grandes aplicações dos compostos fenólicos é na indústria alimentícia, uma vez que estes compostos antioxidantes podem evitar os processos oxidativos dos alimentos. Vários estudos têm demonstrado a crescente preocupação com os possíveis efeitos adversos na saúde de determinados conservantes químicos, juntamente com o crescente interesse em conservar diversos produtos alimentares do processo de oxidação lipídica, e por isso as pesquisas têm-se dirigido no sentido de encontrar produtos naturais com actividade antioxidante, os quais permitirão substituir os produtos sintéticos ou fazer associações entre eles, com o intuito de diminuir a sua quantidade nos alimentos. Por exemplo, os antioxidantes sintéticos como o BHA (terc-butil-hidroxianisol), BHT (butil-hidroxitolueno) e o TBHQ (butil-hidroquinona) utilizados na preservação da qualidade e segurança dos alimentos, têm sido cada vez mais substituídos por antioxidantes naturais, nomeadamente por compostos fenólicos (Balasundram et al., 2006).

Os compostos fenólicos, em particular os flavonóides, possuem uma estrutura ideal para a neutralização de radicais livres e têm demonstrado serem poderosos antioxidantes. A actividade antioxidante destes compostos depende da sua estrutura e pode ser determinada por diversos factores: reactividade como agentes doadores de hidrogénio e electrões, estabilidade do radical fenoxilo formado, reactividade com outros antioxidantes, capacidade quelante de metais de transição, interacção com enzimas envolvidas na produção de espécies reactivas de oxigénio e azoto, e por último solubilidade e interacção com as membranas (Rice-Evans et al., 1997).

A capacidade de neutralização de radicais livres está directamente ligada à capacidade de oxidação dos polifenóis. Estes compostos são capazes de inibir a oxidação de vários substratos, desde moléculas simples a polímeros e biosistemas complexos, através de dois mecanismos: (i) inibição da formação de radicais livres que possibilitam a etapa de iniciação; (ii) eliminação de radicais importantes na etapa de propagação, como os radicais alcóxido e peróxido, através da doação de átomos de hidrogénio a estas moléculas, interrompendo a reacção em cadeia. Os produtos intermediários formados são relativamente estáveis devido à ressonância do sistema aromático, o que impede a propagação em cadeia (figura 5) (Gonçalves, 2006; Balasundram, 2006; Wood et al., 2002; Rice-Evans et al., 1997).

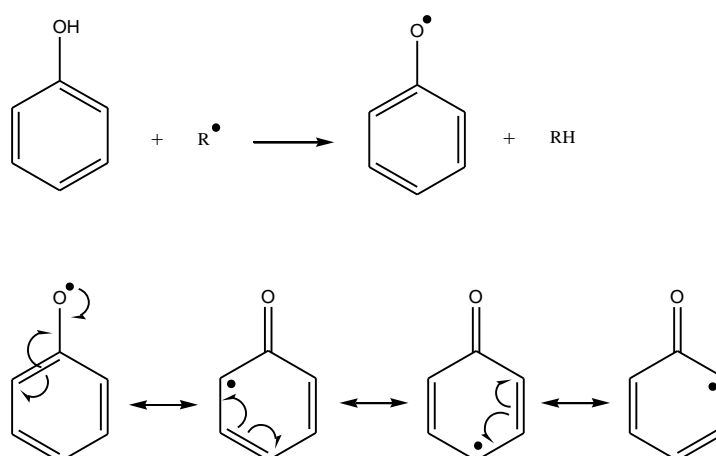


Figura 5 - Eliminação de radicais livres pelos compostos fenólicos (Adaptado de Gonçalves, 2006).

Muitas das acções biológicas dos compostos fenólicos podem ser atribuídas às suas propriedades antioxidantes, quer através das suas propriedades redutoras, quer através da influência que exercem no estado redox do meio intracelular (Gonçalves, 2006; Willits et al., 2004; Heim et al., 2002). Estes compostos podem exercer a sua acção antioxidante neutralizando radicais livres e espécies reactivas de oxigénio, como os aniões peróxido, os radicais hidroxilo, os peróxidos lipídicos e os hidroperóxidos, embora também desempenhem uma função preventiva na oxidação das lipoproteínas de baixa densidade (LDL). Deste modo, os compostos fenólicos anulam os efeitos negativos destas espécies sobre as células, como por exemplo o envelhecimento celular, mutagénese, carcinogénese e doenças coronárias. O efeito antioxidante depende tanto do ambiente no qual a planta está envolvida como da concentração e composição do extracto antioxidante (Sokół-Lętowska et al., 2006; Balasundram, 2006; Heim et al., 2002; Meyer et al., 1998; Rice-Evans et al., 1997; Cook, Samman, 1996).

Os polifenóis também possuem capacidade quelante de iões metálicos envolvidos na produção de radicais livres, particularmente ferro e cobre. No entanto, compostos com menor potencial de oxidação do que o Fe^{3+} e o Cu^{2+} podem reduzir esses metais funcionando como pro-oxidantes (Balasundram, 2006; Heim et al., 2002; Rice-Evans et al., 1997).

O consumo de antioxidantes naturais, como os compostos fenólicos, apresenta características benéficas para o ser humano, pois está relacionada com a defesa de diferentes doenças humanas, incluindo cancro, arteriosclerose, artrite, diabetes e processos de envelhecimento, apresentando ainda propriedades anti-inflamatórias, antimutagénicas, antialérgicas, antivirais e antimicrobianas. Apresentam também uma diminuição considerável do risco de morte por acidentes cardiovasculares, através da ingestão de maiores quantidades de flavonóides, através de alimentos de origem vegetal, como frutos, hortaliças, chá, mel, entre outros (Sokół-Lętowska et al., 2006; Chirinos et al., 2007; Naczek, Shahidi, 2006; Balasundram et al., 2006; Gonçalves, 2006; Meyer et al., 1998; Rice-Evans et al., 1997).

1.4. Flavonóides

Os flavonóides representam um grupo de compostos fenólicos de grande importância e fazem parte integrante da dieta humana. Estes compostos são responsáveis pela maioria dos pigmentos amarelos, rosas, vermelhos, roxos e azuis de flores, frutas e legumes (Wood et al., 2002; Gonçalves, 2006). Os flavonóides são compostos de baixo peso molecular, com estrutura geral C₆-C₃-C₆ (figura 6), caracterizados pela presença de dois núcleos fenólicos ligados por uma cadeia de três átomos de carbono, e contêm diferentes grupos substituintes anexados. A sua estrutura baseia-se na fusão dos anéis A e C com o anel fenilo B, estando este grupo fenilo ligado à posição 2 do anel C (numerados a partir da posição do oxigénio) ou ligado à posição 3 no caso dos isoflavonóides (Scherer, Godoy, 2009; Balasundram, 2006; Gonçalves, 2006; Erlund, 2004; Wood et al., 2002; Meyer et al., 1998).

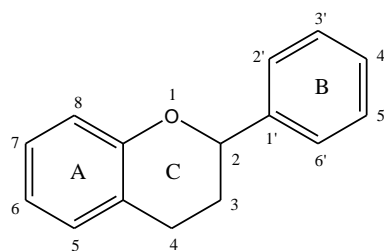


Figura 6 - Estrutura básica de um flavonóide monomérico (Adaptado de Balasundram, 2006).

Constituem um enorme grupo com mais de 6500 compostos já identificados, embora um número muito menor de compostos seja importante do ponto de vista alimentar (Willits et al., 2004). Estima-se que possam existir até 20000 compostos diferentes, devido à grande variedade de substituições que podem ocorrer nos anéis A, B e C, como por exemplo, hidrogenação, hidroxilação, acetilação, metilação, sulfatação e glicosilação. Dependendo das suas estruturas químicas e da orientação dos vários grupos presentes na molécula, os flavonóides têm diferentes actividades biológicas. Alguns flavonóides apresentam propriedades semelhantes às das vitaminas C e E (Wood et al., 2002; Heim et al. 2002; Cook, Samman, 1996).

As funções biológicas deste grupo de compostos nos animais e seres humanos foram inicialmente sugeridas na década de 30 pelo prémio Nobel de Fisiologia e Medicina Albert Szent-Györgyi, quando isolou da casca do limão uma substância, a citrina, que provou regular a permeabilidade dos capilares ao ser consumida. Assim, os flavonóides denominaram-se inicialmente por vitamina P (“preventive”, “permeability”) e também vitamina C2, visto que algumas substâncias pertencentes a esta classe apresentavam propriedades similares à vitamina C. No entanto, cerca de duas décadas mais tarde e depois de numerosos ensaios clínicos, chegou-se à conclusão que não era possível classificar os flavonóides como vitaminas, isto porque, não foi possível estabelecer uma relação directa entre a diversidade estrutural dos flavonóides e a permeabilidade capilar (Gonçalves, 2006).

Actualmente, os flavonóides são considerados importantes antioxidantes naturais, podendo ser consumidos na dieta humana. Estes compostos são responsáveis pela captação de radicais livres e neutralização de espécies reactivas de oxigénio, apresentando assim os mais diversos efeitos benéficos para o ser humano, tal como já foi referido anteriormente (Chirinos et al., 2007; Gonçalves, 2006; Sokół-Lętowska et al., 2006; Balasundram et al., 2006; Naczki, Shahidi, 2006; Wood et al., 2006; Meyer et al., 1998).

Os flavonóides são constituídos por diferentes tipos de compostos, e os seus esqueletos formam-se biossinteticamente segundo o esquema da figura 7. Como se pode observar através deste esquema, a chalcona é o composto que possui o esqueleto mais simples, e a partir deste formam-se outras estruturas por reacções sucessivas catalisadas por enzimas específicas (Lobo, Lourenço, 2007; Gonçalves, 2006). O esqueleto C15 dos flavonóides é biogeneticamente derivado do fenilpropano (C6-C3) e três unidades de acetato (C6) (Gonçalves, 2006; Erlund, 2004; Balasundram, 2006).

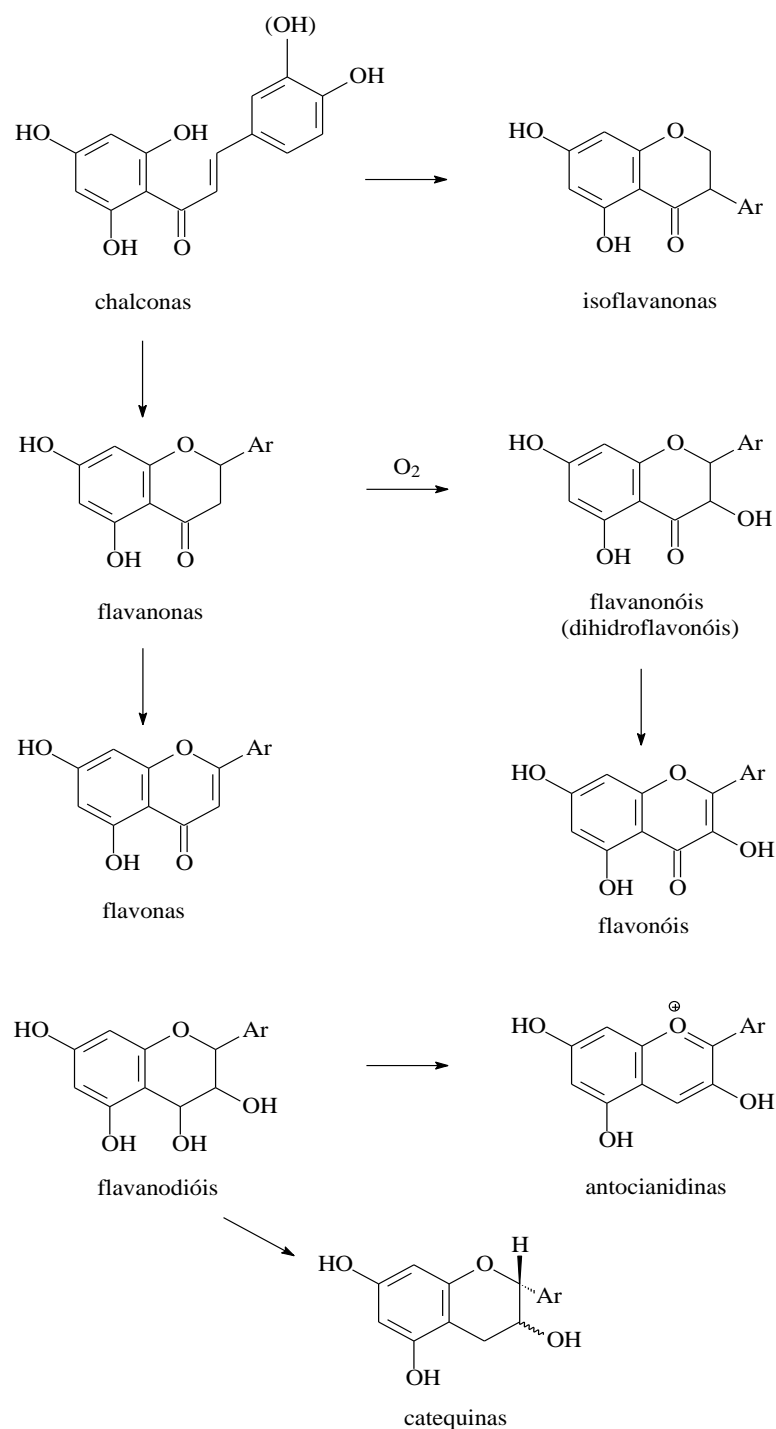


Figura 7 - Biossíntese dos esqueletos dos vários grupos de flavonóides (Adaptado de Lobo, Lourenço, 2007).

O modo de ciclização, o grau de insaturação e o estado de oxidação do anel central dos flavonóides determinam as várias classes em que são divididos, incluindo chalconas, flavonóis, flavanóis (catequinas), flavonas, flavanonas, antocianinas e isoflavanonas, e estão amplamente distribuídos na dieta humana (Wood et al., 2002; Balasundram, 2006; Gonçalves, 2006; Erlund, 2004; Cook, Samman, 1996).

Habitualmente, os flavonóides são encontrados nas plantas na forma livre ou conjugada. Estes compostos (excepto os flavanóis) podem estar conjugados com moléculas de açúcar ligadas ao hidroxilo fenólico (O-heterósidos). Estes formam-se através da união de açúcares à posição 3 do anel C ou à posição 5 ou 7 do anel A (os açúcares ligados ao anel B são raros), sendo a primeira substituição a mais frequente. Os açúcares mais comuns são D-glucose, L-ramnose, D-galactose e L-arabinose, porém, existe um grande número de monossacáridos diferentes ou combinações destes que podem ligar-se aos diferentes grupos hidroxilo do flavonóide, resultando em um grande número de glicosídeos conhecidos. As moléculas desprovidas de açúcares são denominadas agliconas (Gonçalves, 2006; Willits et al., 2004; Erlund, 2004; Heim et al., 2002; Cook, Samman, 1996).

Os flavonóides também se podem encontrar na forma de polímeros com diferentes graus de polimerização, podendo ser monómeros, dímeros ou oligómeros. Os compostos poliméricos estão divididos em dois grandes grupos, designados taninos condensados e hidrolisáveis, cujas estruturas são muito diferentes entre si (Cook, Samman, 1996).

A actividade biológica dos flavonóides depende da estrutura química e dos vários substituintes da molécula, uma vez que a estrutura básica pode sofrer uma série de modificações, tais como glicosilação, esterificação, hidroxilação, metilação, entre outras alterações que irão modular a polaridade, toxicidade e direccionamento intracelular destes compostos (Erlund, 2004).

1.4.1. Flavanonas

As flavanonas são caracterizadas pela ausência da ligação dupla nos carbonos 2 e 3 do anel C, possibilitando o posicionamento do anel B em posição R ou S. Este grupo de compostos também é caracterizado pela ausência do grupo hidroxilo na posição 3 do anel C. As flavanonas são intermediários biossintéticos da maioria das classes dos flavonóides. Os compostos naringenina, hesperitina e naringenina-7-O-glucósido, representados na figura 8, são as flavanonas mais importantes (Gonçalves, 2006; Erlund, 2004).

A principal fonte de flavanonas na dieta humana são as frutas cítricas. Podem possuir sabor amargo ou doce, devido às configurações estereoquímicas. Pequenas modificações na molécula, sejam nas posições e/ou na natureza dos açúcares ou outros substituintes no anel A e/ou B, podem conduzir a grandes alterações nas propriedades físicas deste tipo de compostos (Erlund, 2004).

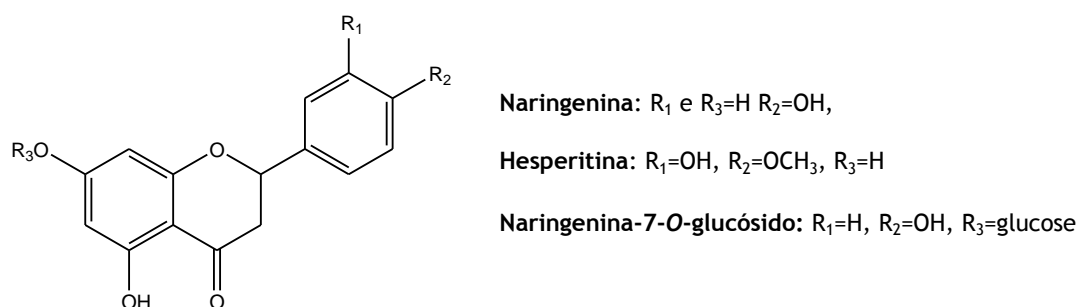


Figura 8 - Flavanonas (Adaptado de Willits et al., 2004).

1.4.2. Flavonas

As flavonas são caracterizadas pela presença de uma insaturação no anel heterocíclico C entre a posição C2-C3 e não possuem nenhum grupo hidroxilo na posição 3 (Erlund, 2004; Lobo, Lourenço, 2007; Willits et al., 2004). As flavonas estão presentes na maior parte dos vegetais, podendo também ser encontradas nos cereais e ervas aromáticas, como é o exemplo da salsa, alecrim e tomilho. As flavonas mais comuns na dieta humana são os compostos luteolina e apigenina (figura 9). Ambos os compostos que pertencem a esta classe de flavonóides podem formar ligações glicosídicas, que promovem uma melhor absorção intestinal (Hollman, Arts, 2000; Willits et al., 2004; Naczek, Shahidi, 2006).

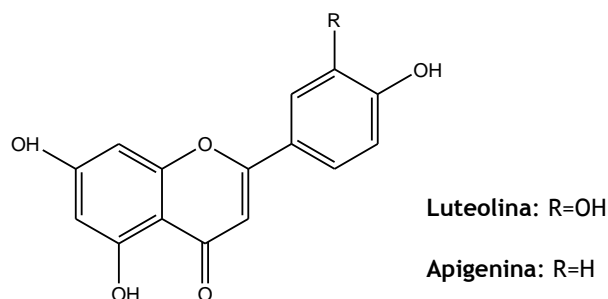


Figura 9 - Flavonas (Adaptado de Willits et al., 2004).

Esta classe de flavonóides contribui para a pigmentação amarela dos tecidos das plantas e para o sabor dos alimentos, existindo assim flavonas que aumentam ou diminuem o sabor amargo dos alimentos. Muitas flavonas apresentam também propriedades biocidas, farmacológicas e antioxidantes (Hollman, Arts, 2000).

1.4.3. Flavonóis

Os flavonóis são compostos que apresentam uma estrutura química muito parecida à estrutura das flavonas, no entanto, diferem destes compostos pois apresentam um grupo hidroxilo na posição 3 do anel C. Os compostos quercetina, rutina, canferol, miricetina e isorramnetina, representados na figura 10, são os flavonóis mais importantes (Willits et al., 2004; Erlund, 2004; Cook, Samman, 1996).

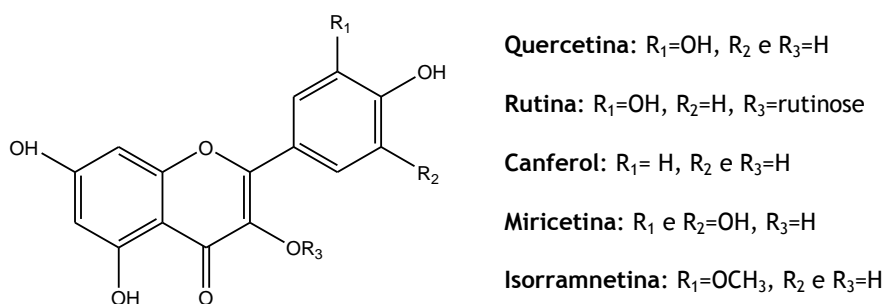


Figura 10 - Flavonóis (Adaptado de Willits et al., 2004; Gonçalves, 2006).

Os flavonóis predominam em todos os alimentos de origem vegetal. O composto canferol é o mais comum entre as frutas e verduras, sendo também encontrado em algumas ervas e legumes. A isorramnetina pode ser encontrada em cebolas e pêras, enquanto o composto miricetina é encontrado com mais frequência em frutos, milho e chá. Nos frutos, os flavonóis e os seus glicosídeos são encontrados predominantemente na pele. O composto quercetina é o flavonol mais comum da dieta humana, podendo estar presente em diversas formas glicosídicas. Este está presente em várias frutas e vegetais, mas as maiores concentrações são encontradas na cebola e maçã, no entanto, na cereja, o flavonol rutina (quercetina-3-O-rutinósido) é o mais abundante (Gonçalves, 2006; Erlund, 2004).

1.4.4. Flavanóis

Os flavanóis (figura 11), também denominados flavano-3-ol ou catequinas, caracterizam-se por possuírem um anel heterocíclico C saturado, e os carbonos 2 e 3 são os centros assimétricos da molécula. Estes compostos geralmente ocorrem como agliconas ou esterificados com o ácido gálico. Possuem uma característica estrutural em comum com as antocianidinas, pois não possuem o oxigênio na posição 4 do anel C heterocíclico (Hollman, Arts, 2000; Erlund, 2004).

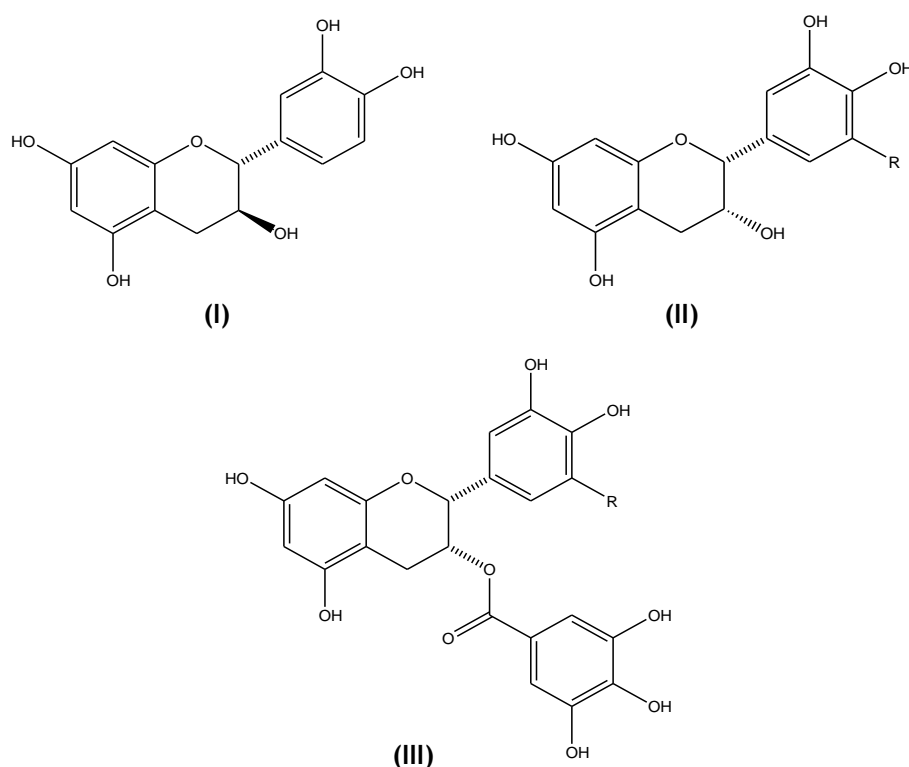


Figura 11 - Flavanóis: (+)-catequina (I), (-)-epicatequina (II, R=H), (-)-epigallocatequina (II, R=OH), (-)-epicatequina-3-O-galato (III, R=H) e (-)-epigallocatequina-3-O-galato (III, R=OH) (Adaptado de Hollman, Arts, 2000).

Os flavanóis são considerados poderosos antioxidantes dietéticos e demonstram uma forte capacidade de diminuição de doenças cardiovasculares e cancro. Podem ser encontrados em várias frutas e legumes, como maçãs, pêras, uvas e pêssegos, no entanto, estão presentes em grandes quantidades no vinho tinto e no chá (preto e verde). Estudos realizados evidenciaram que o consumo de chá verde está associado com a redução do risco cardiovascular e proporciona a protecção contra a peroxidação lipídica renal, enquanto que o chá preto apresenta uma maior protecção contra a peroxidação lipídica do fígado (Naczki, Shahidi, 2006; Hollman, Arts, 2000; Erlund, 2004).

Os flavanóis também se podem apresentar como proantocianidinas. A unidade estrutural das proantocianidinas é a molécula flavano-3-ol, e podem ser dímeros, trímeros, oligómeros ou polímeros (figura 12), consoante o número de vezes que esta unidade se repete, podendo atingir elevados pesos moleculares. Estes compostos são largamente encontrados no reino vegetal e contribuem para a adstringência e o sabor amargo dos alimentos, particularmente antes da maturação. Durante o amadurecimento há uma perda de adstringência nos frutos, uma vez que existe durante a maturação uma diminuição de proantocianidinas. São também responsáveis pela pigmentação castanha existente em algumas plantas (Gonçalves, 2006; Heim et al., 2002; Hollman, Arts, 2000).

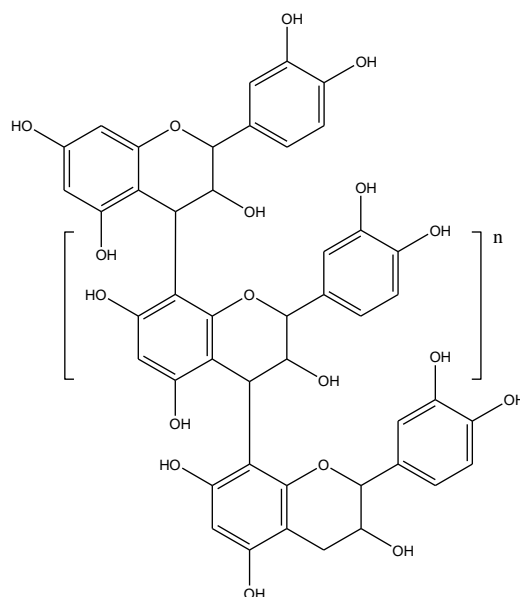


Figura 12 - Exemplo de uma proantocianidina (Adaptado de Wood et al., 2002).

As proantocianidinas têm suscitado um interesse cada vez maior em virtude de lhe serem atribuídas algumas propriedades nutricionais e farmacológicas, tais como actividade anticarcinogénica, antimicrobiana e antioxidante. A maior actividade antioxidante pertence ao grupo dos flavanóis, em especial ao grupo das proantocianidinas. Estes compostos são poderosos antioxidantes que captam radicais livres, sendo ainda mais poderosos que qualquer vitamina C ou E (Sokół-Lętowska et al., 2006; Hollman, Arts, 2000; Wood et al., 2000).

As procianidinas oligoméricas (OPCs) são bastante abundantes em sementes de uvas (*Vitis vinífera*) e pinho (*Pinus marítima*, *Pinus pinaster*, *Pinus sylvestris* L.), bem como em maçãs, bagas, cevada, entre outros (Sokół-Lętowska et al., 2006).

1.4.5. Antocianinas

Os flavonóides incluem também antocianinas, que são pigmentos fenólicos solúveis em água, amplamente distribuídos no reino vegetal. A cor das antocianinas varia do vermelho ao azul, apresentando-se também como uma mistura de ambas as cores resultando em tons púrpura. Muitos frutos, folhas e flores devem a sua atractiva coloração a estes pigmentos que se encontram dispersos nos vacúolos celulares. Embora as antocianinas sejam encontradas em cereais, raízes e vegetais, estas são especialmente associadas a frutos, como por exemplo, ameixas, maçãs, beringela, uva, morango, cereja, entre outros. As antocianinas podem ser usadas como corantes para bebidas e outros produtos alimentares (Gonçalves, 2006; Erlund, 2004; Wood et al. 2002; Heim et al., 2002; Cook, Samman, 1996).

Na natureza, encontram-se associadas a moléculas de açúcares, mas quando estão livres são denominadas antocianidinas, que são as agliconas das antocianinas. Foram identificadas nas plantas cerca de 200 antocianinas diferentes, sendo 70 destas identificadas em frutos. Contudo, as antocianinas mais comuns são delfinidina, cianidina, malvidina, pelargonidina, peonidina e petunidina (figura 13). Os compostos cianidina-3-*O*-rutinósido e 3-*O*-glucósido são as mais abundantes na cereja, no entanto, também surgem em menores quantidades os compostos peonidina-3-*O*-rutinósido e 3-*O*-glucósido e o pelargonidina-3-*O*-rutinósido (Gonçalves, 2006; Erlund, 2004; Kong et al., 2003; Wood et al., 2002).

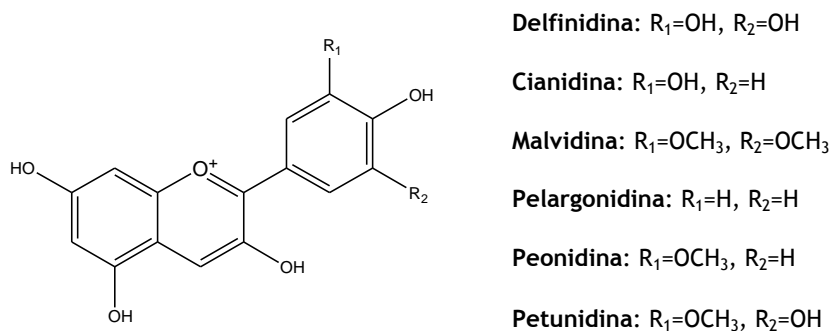


Figura 13 - Antocianidinas (Adaptado de Kong et al., 2003).

A cor das antocianinas varia consoante as estruturas químicas, ou seja, em função do grau de hidroxilação e metilação do anel B. Geralmente a cor varia do vermelho ao azul com o aumento dos grupos hidroxilo e o efeito inverso observa-se quando se substituem estes grupos por grupos metoxilo. A cor que as antocianinas apresentam também pode variar consoante o pH, isto é, normalmente a pH 3,5 a antocianina é vermelha e à medida que o pH aumenta a cor muda para azul. A presença de iões metálicos, mistura de pigmentos e co-pigmentos, e condições de processamento e armazenamento (temperatura, teor em hidratos de carbono, presença de ácido ascórbico, entre outros) também contribui para a intensidade da cor das antocianinas (Gonçalves, 2006; Kong et al., 2003).

As antocianinas possuem uma grande importância económica, pois são os compostos mais importantes no que se refere à cor dos vinhos e das uvas. Esta propriedade é um factor essencial para a funcionalidade, bem como para a imagem final do produto. Nos últimos anos, o interesse por esses pigmentos intensificou-se, uma vez que as pesquisas têm demonstrado que as antocianinas e as suas respectivas agliconas, são compostos bioactivos e possuem capacidade antioxidante, entre vários outros efeitos farmacológicos (Kong et al. 2003; Wood et al., 2002).

1.4.6. Relação estrutura-actividade antioxidante

De um modo geral, e como já foi mencionado anteriormente, a actividade antioxidante dos compostos fenólicos, mais especificamente dos flavonóides, é devida à sua capacidade de neutralização de radicais livres e espécies reactivas de oxigénio, e também devido às suas propriedades quelantes de metais de transição. A relação que existe entre a estrutura química e a actividade antioxidante, geralmente é mais complicada para os flavonóides do que para os restantes compostos fenólicos, isto devido à complexidade relativa das estruturas químicas dos flavonóides (Balasundram et al., 2006).

A actividade antioxidante dos flavonóides é determinada pela sua estrutura, em particular pelo número e arranjo dos grupos funcionais em torno do esqueleto base destas moléculas. Deste modo (Balasundram et al., 2006; Heim et al., 2002; Rice-Evans et al., 1997; Cook, Samman, 1996):

- o número de grupos hidroxilo existentes na molécula flavonóide contribui directamente para o potencial antioxidante, ou seja, quanto maior for o número de grupos hidroxilo presentes na molécula maior é a actividade antioxidante que estes compostos possuem. Por exemplo, o composto miricetina (posição dos grupos OH: 3, 5, 7, 3', 4', 5') possui maior capacidade antioxidante que o composto canferol (posição dos grupos OH: 3, 5, 7, 4');
- a configuração dos grupos hidroxilo no anel B (substituição *orto* 3',4'-di-hidroxi) é a principal responsável pela neutralização de espécies reactivas de oxigénio e azoto (por exemplo no composto catequina, luteolina e quercetina) (figura 14A);
- a existência da dupla ligação entre C2 e C3 em combinação com o grupo carbonilo na posição 4 do anel C facilita a deslocação de electrões e a estabilização por ressonância, contribuindo para um maior potencial antioxidante (figura 14B). Para exemplificar esta situação, temos o composto (+)-catequina que apresenta menor actividade antioxidante que o composto quercetina;
- a presença de grupos hidroxilo na posição 3 do anel C em combinação com o grupo carbonilo na posição 4 do anel C contribui também para o potencial antioxidante dos flavonóides (figura 14C). Por exemplo, os compostos quercetina e canferol são potentes antioxidantes em comparação com os compostos naringenina e apigenina. Os grupos hidroxilo nas posições 5 e 7 do anel A são de menor importância;
- a glicosilação e a metilação reduzem a capacidade antioxidante dos flavonóides, quando comparada com as respectivas agliconas, devido ao impedimento estereoquímico, à diminuição da coplanaridade entre o anel B e a restante estrutura química e ao aumento da hidrofobicidade que influencia o acesso do antioxidante à fase lipídica.

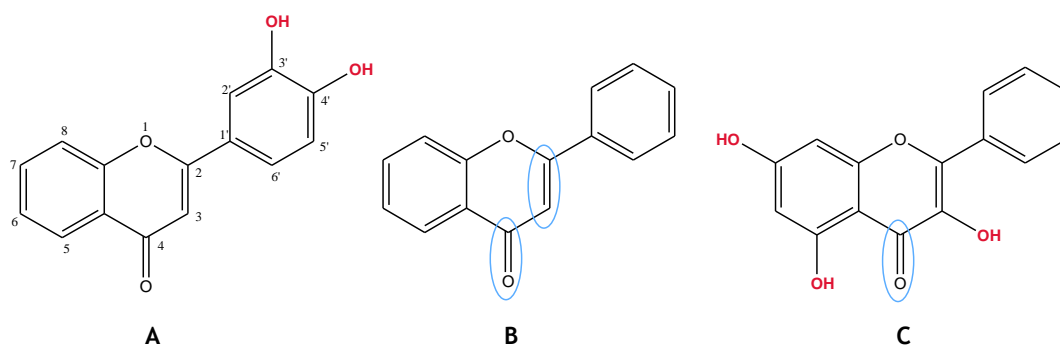


Figura 14 - Relação estrutura/actividade antioxidante dos flavonóides (Adaptado de Valentão, 2003).

De facto, vários estudos demonstram que o número e a posição dos grupos hidroxilo, as ligações glicosídicas e os grupos metilo interferem na actividade antioxidante dos flavonóides. Assim, pode afirmar-se que as ligações glicosídicas e os grupos metilo diminuem a actividade antioxidante dos flavonóides, enquanto a hidroxilação do anel B, o grupo carbonilo na posição 4 e os grupos hidroxilo na posição 3 aumentam a actividade antioxidante. De uma maneira geral, a actividade antioxidante diminui na seguinte ordem: flavanol > flavonol > chalcona > flavona > flavanona > isoflavona (Rice-Evans et al., 1997).

1.5. Determinação da actividade antioxidante

Qualquer organismo aeróbio tem a capacidade de criar sistemas de protecção, de maneira a tentar minimizar os danos causados por agentes oxidantes que podem ser resultantes, por exemplo, do metabolismo celular do oxigénio (Gonçalves, 2006).

Um antioxidante é definido como uma substância que, quando presente em baixas concentrações, comparativamente às de um substrato oxidável, atrasa ou inibe significativamente a oxidação desse substrato. Como exemplo de substratos oxidáveis nas células temos as proteínas, os lípidos, os hidratos de carbono e o DNA (Sousa et al., 2007; Gonçalves, 2006; Nacz et al., 2006).

Os antioxidantes que representam a defesa dos organismos contra as espécies reactivas de oxigénio (ROS) são divididos em dois tipos principais, os enzimáticos e os não enzimáticos. As enzimas superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase representam a principal defesa enzimática nos organismos superiores. No entanto, a maior parte dos antioxidantes são provenientes da dieta humana (não enzimáticos), nomeadamente o ácido ascórbico, o α -tocoferol (vitamina E), o β -caroteno e alguns minerais (Gonçalves, 2006; Sokół-Lętowska et al., 2006). Para além destes antioxidantes “tradicionais”, os compostos fenólicos presentes em frutos e vegetais têm demonstrado possuir clara actividade antioxidante e têm sido associados a uma menor incidência de doenças relacionadas com o stress oxidativo. É,

portanto de grande interesse a qualidade dos alimentos que consumimos, havendo por isso a necessidade de métodos convenientes para uma rápida e simples quantificação da capacidade antioxidante (Sokół-Lętowska et al., 2006; Chirinos et al., 2007; Naczek et al., 2006; Gonçalves, 2006).

Diversas técnicas têm sido utilizadas para determinar a actividade antioxidante de extractos vegetais e de composto isolados, como o ensaio FRAP (“Ferric Reducing Antioxidant Power”), o ensaio ORAC (“Oxygen Radical Absorbance Capacity”), o ensaio ESR (“Electron Spin Resonance”), o ensaio TEAC (“Trolox Equivalent Antioxidant Capacity”) e por último o método do radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazilo) (Tabart et al., 2009; Scherer, Godoy, 2009). No entanto, torna-se difícil medir a acção de cada composto separadamente, devido à grande diversidade de componentes antioxidantes presentes nos vegetais e outros alimentos. Além disso, podem ocorrer interacções sinérgicas entre os compostos antioxidantes de uma mistura alimentar (Moreira et al., 2008; Chirinos et al., 2007; Sokół-Lętowska et al., 2006; Naczek et al., 2006).

O método do radical DPPH consiste na captação do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH•) de cor violeta, por antioxidantes que podem ceder um átomo de hidrogénio. O radical DPPH possui uma coloração púrpura e absorve a 515 nm, podendo ser facilmente detectado por espectroscopia. Por acção de um antioxidante (AH), o radical DPPH é reduzido formando difenil-picril-hidrazina, que possui uma coloração amarela (figura 15), com consequente decréscimo da absorvência. Os resultados são expressos numa relação percentual da diminuição da absorvência da solução DPPH• na presença do extracto a 515 nm com a solução DPPH• no mesmo comprimento de onda (Tabart et al., 2009; Sousa et al., 2007; Kroyer, Hegedus, 2001; Sánchez-Moreno et al., 1998; Brand-Williams et al., 1995).

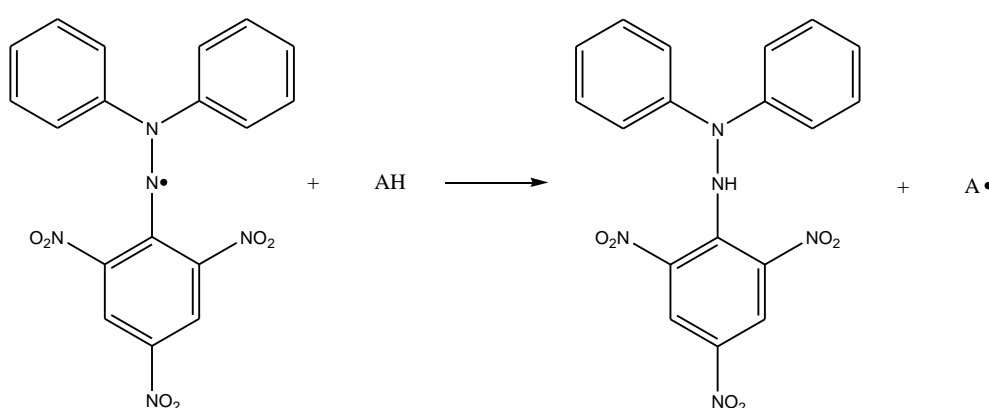


Figura 15 - Reacção de redução do radical DPPH por acção de antioxidantes (AH) (Adaptado de Sousa et al., 2007).

O radical DPPH é conhecido como um radical livre estável, no entanto, é sensível à luz, oxigénio, pH e ao tipo de solvente utilizado. Os solventes metanol e etanol são os mais utilizados neste método (Tabart et al., 2009; Scherer, Godoy, 2009).

1.6. Compostos com actividade antioxidante

Várias espécies de plantas têm-se mostrado potencialmente úteis, devido aos seus constituintes fenólicos com efeitos antioxidantes. Estes compostos polifenólicos podem ser encontrados nas folhas, casca, alburno e cerne das árvores. A presença destes compostos na madeira confere a esta diversas aplicações, tais como em farmacologia, agricultura e medicina (Gonçalves, 2006; Balasundram et al., 2006; Naczki, Shahidi, 2006; Wood et al., 2002).

Um dos exemplos que se pode citar é a presença de diversos polifenóis na constituição do propolis, uma substância de origem resinosa produzida pelas abelhas, que lhe atribui propriedades importantes, nomeadamente acção anti-inflamatória, antimicrobiana e antitumoral, entre outras. Os principais compostos identificados foram quercetina, apigenina, canferol, pinobanksina, pinocembrina, e pinobanksina 3-acetato (Moreira et al., 2008).

No estudo das plantas, muitos outros compostos foram já identificados, sendo possível observar através de diversos estudos que desempenham os mais variados benefícios para o homem. Esta razão torna o estudo das plantas uma ciência complexa mas bastante aliciante.

Na figura 16 encontram-se somente alguns exemplos de estruturas de compostos fenólicos importantes, com capacidade antioxidante, que foram isolados e caracterizados a partir de diferentes espécies de plantas, tais como *Picea abies*, *Pinus sylvestris*, *Larix sibirica*, *Larix gmelinni* e *Scutellaria baicalensis* (Willför et al., 2003; Lopes, 2007; Gao et al., 1999).

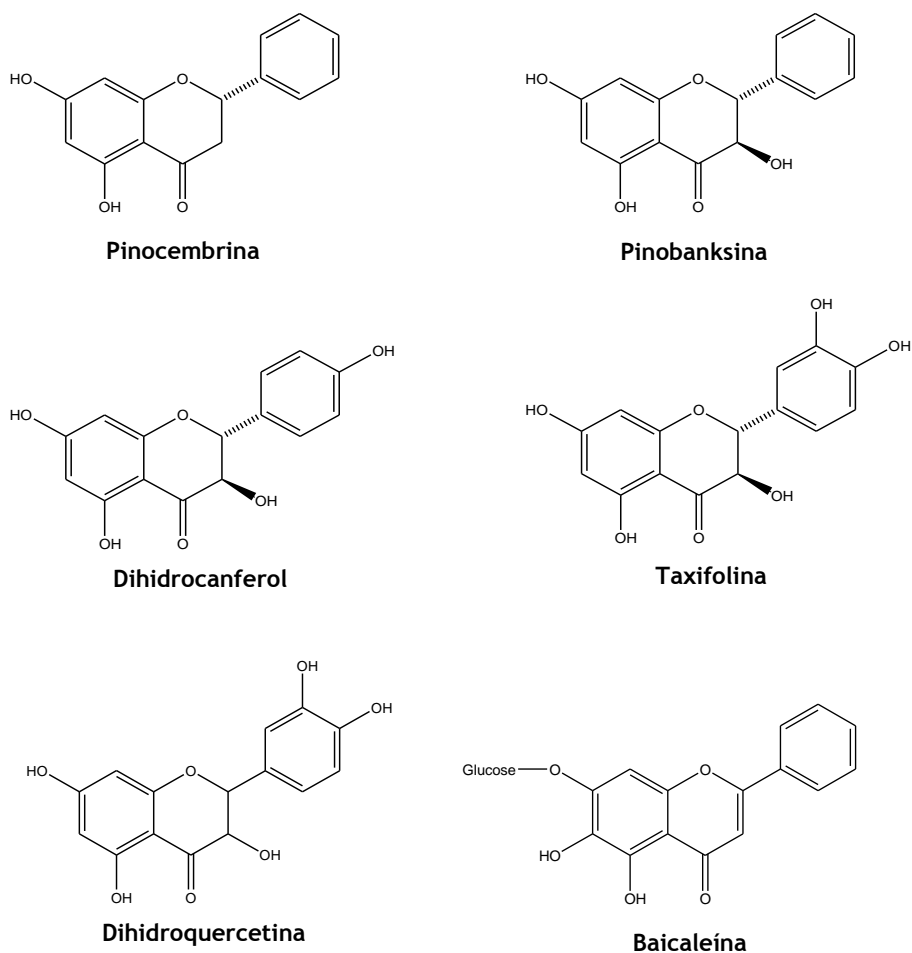


Figura 16 - Estruturas de alguns compostos fenólicos com propriedades antioxidantes isolados a partir de diferentes espécies de plantas.

A figura 17 apresenta algumas estruturas de compostos isolados e caracterizados do género *Prunus* (*Prunus davidiana*, *Prunus cerasus* e *Prunus avium*), que conferem a estas plantas uma potencial actividade antioxidante (González-Gómez et al., 2010; Serra et al., 2010; Kirakosyan et al., 2010; Geibel et al., 2001; Yokozawa et al., 1991).

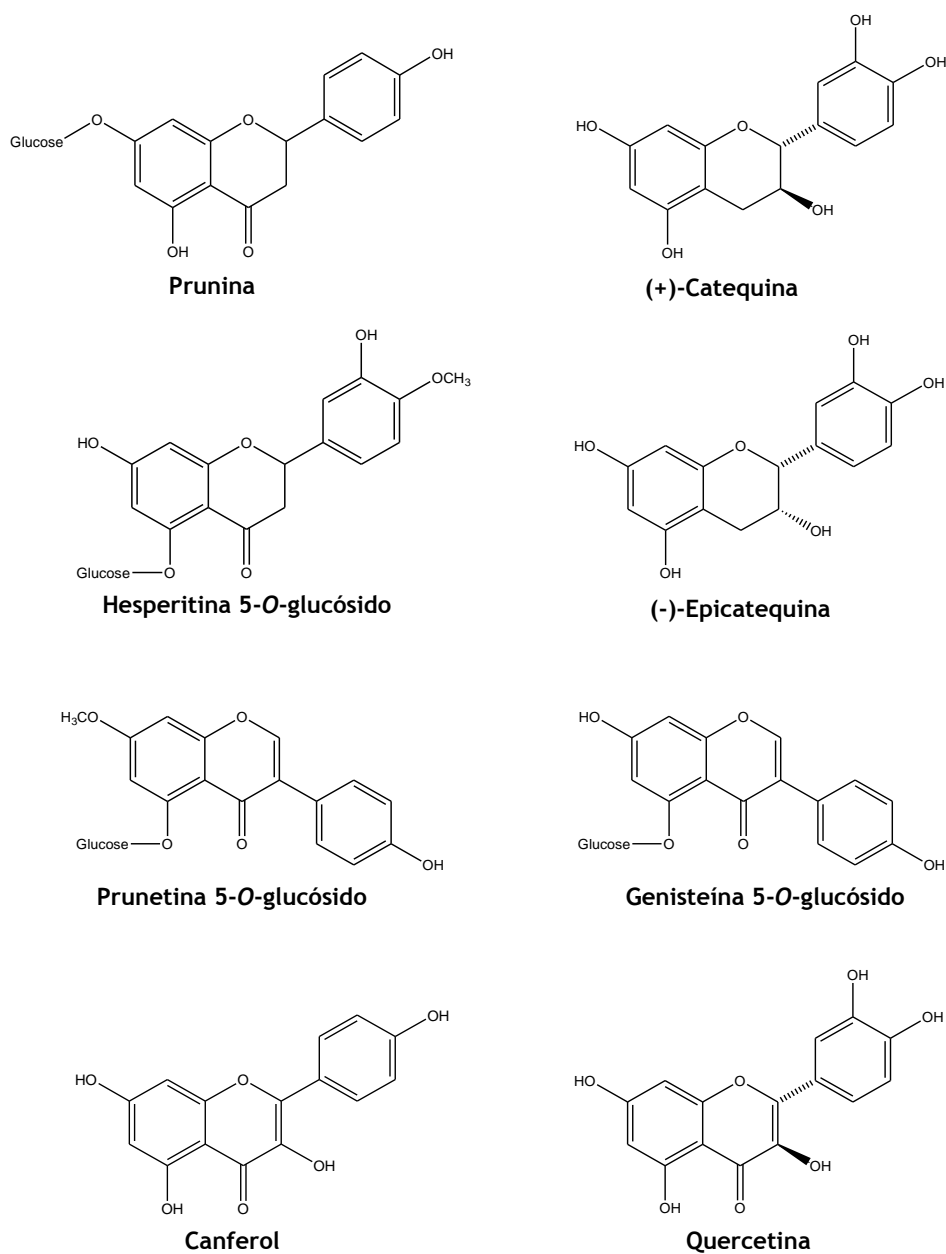


Figura 17 - Estruturas de alguns compostos fenólicos do género *Prunus* com potencial actividade antioxidante.

Foram aqui citados alguns dos compostos mais importantes com propriedades antioxidantes, no entanto, muitos outros exemplos poderiam ser enumerados. Estes compostos, tal como já foi referido anteriormente, conferem às plantas um enorme importância medicinal e económica, sendo por isso o isolamento e caracterização estrutural dos compostos biologicamente activos um estudo muito complexo mas bastante aliciante.

CAPÍTULO 2

RESULTADOS E DISCUSSÃO

2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.1. Objectivo

Este trabalho teve como objectivo a separação, purificação e caracterização estrutural de compostos existentes na espécie *Prunus avium*, com potencial actividade antioxidante.

Foram efectuadas diversas extracções contínuas sólido-líquido, com solventes distintos, a várias partes da árvore de cerejeira, tal como a madeira, as folhas, os pés de cereja e a casca da madeira. Posteriormente realizou-se uma análise quantitativa dos compostos existentes nos extractos da madeira de n-hexano e acetona, através da combinação das técnicas de cromatografia gasosa/ espectrometria de massa (GC-MS).

O isolamento dos compostos fenólicos foi efectuado na madeira de cerejeira, uma vez que a presença destes produtos é maioritária relativamente aos outros extractos. Deste modo, foram realizadas diversas separações e purificações ao extracto de acetona da madeira, de modo a obter alguns derivados fenólicos presentes na cerejeira. As separações foram realizadas por meio de cromatografia em coluna em sílica gel a pressão moderada, utilizando-se a cromatografia em camada fina para analisar os produtos isolados.

Os produtos puros foram caracterizados estruturalmente através das técnicas de ressonância magnética nuclear de protão (^1H -RMN), ressonância magnética nuclear de carbono (^{13}C -RMN), ressonância magnética nuclear bidimensional (RMN-2D) e espectroscopia de infravermelho (IV).

Neste estudo foi também realizada a análise quantitativa da capacidade antioxidante dos extractos da madeira, das folhas, dos pés de cereja e da casca da madeira de cerejeira, bem como do composto catequina isolado a partir do extracto da madeira de cerejeira com acetona, utilizando-se como referência o clássico antioxidante quercetina. Para alcançar este objectivo, utilizou-se o método do radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazilo).

2.2. Extracção do material vegetal

O material vegetal utilizado neste estudo (casca, pés de cereja, folhas e madeira de cerejeira) foi extraído segundo uma metodologia simples e amplamente utilizada por diversos investigadores, designado por extracção contínua com extractor Soxhlet. As condições experimentais utilizadas em ambos os extractos foram idênticas, ou seja, a extracção foi realizada utilizando 100g de material vegetal durante um período de 24h para cada solvente utilizado.

A casca da madeira de cerejeira previamente seca e moída foi submetida a uma extracção com n-hexano e de seguida com acetona (extractor de Soxhlet), onde se obtiveram as respectivas quantidades de 2,16g (2,2%) e 10,59g (10,6%) de extracto.

Os pés de cereja secos foram moídos e submetidos a uma extracção com o extractor de Soxhlet. Na extracção efectuada com n-hexano obteve-se 1,20g (1,2%) de extracto e na extracção com acetona obteve-se 8,74g (8,7%) de extracto.

As folhas da árvore de cerejeira foram previamente secas e em seguida moídas. Na extracção efectuada com n-hexano obteve-se 5,32g (5,32%) de extracto concentrado. De seguida, foi efectuada a extracção com acetona onde se obteve 7,71g (7,71%).

Foram utilizadas duas madeiras da árvore de cerejeira com diferentes idades (10 e 30 anos). Estas madeiras secas e moídas foram submetidas a uma extracção contínua com extractor de Soxhlet utilizando. Na extracção realizada à madeira da árvore de cerejeira mais velha obteve-se 0,30g (0,30%) de extracto com n-hexano e 6,85g (6,85%) de extracto com acetona. Na extracção realizada à madeira da árvore de cerejeira com menos idade, obteve-se 0,95g (0,95%) de extracto com n-hexano e 5,09g (5,09%) de extracto com acetona.

Para além destas extracções realizadas com o extractor de Soxhlet, a madeira da árvore de cerejeira, foi também sujeita a duas extracções a frio, utilizando como solventes acetona e acetato de etilo. Na extracção efectuada com acetona obteve-se 1,82g (1,82%) de extracto e na extracção realizada com acetato de etilo obteve-se 1,10g (1,10%) de extracto concentrado.

A figura 18 apresenta as quantidades de extracto obtidas em ambas as extracções realizadas (casca, pés, folhas e madeira).

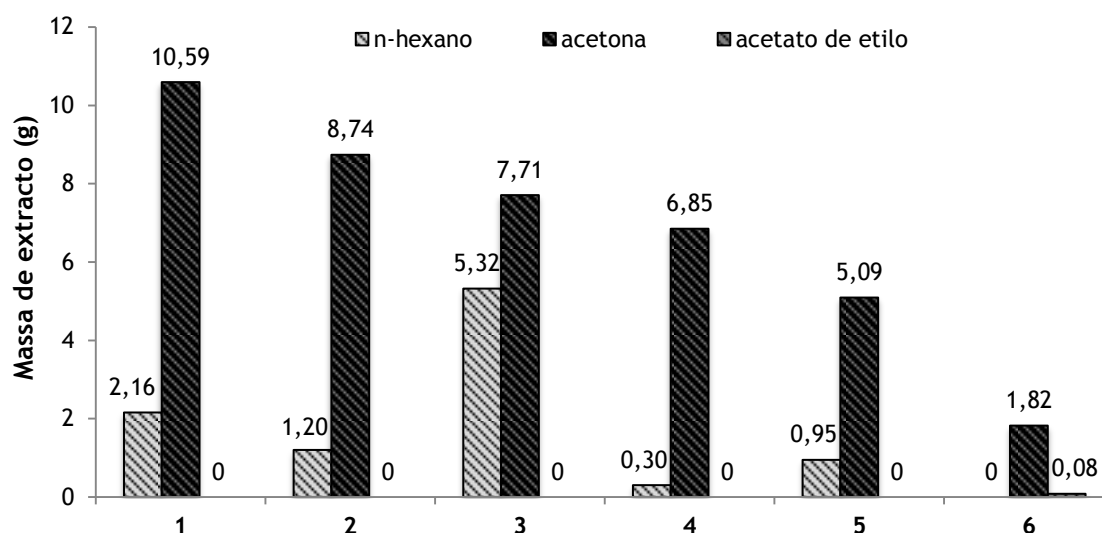


Figura 18 - Massas obtidas dos extractos com os diferentes solventes/100g de material vegetal: (1) Casca da madeira; (2) Pés de cereja; (3) Folhas; (4) Madeira 30 anos (extractor de Soxhlet); (5) Madeira 10 anos (extractor de Soxhlet); (6) Madeira (extracção a frio).

Pela análise do gráfico apresentado na figura 18 é possível observar que o método de extracção com extractor de Soxhlet apresenta os melhores resultados de extracção relativamente à extracção realizada a frio, uma vez que a amostra está sempre em contacto com o solvente, havendo a sua constante remoção; a temperatura do sistema mantém-se relativamente alta, visto que o calor aplicado para o processo de evaporação é constante; possibilita a extracção de maior quantidade de amostra em relação ao método de extracção a frio. Para além destas vantagens, não existe necessidade de filtração do extracto após a extracção terminar, uma vez que a amostra esteve envolvida num cartucho durante todo o procedimento, o que não acontece com a extracção a frio que necessita de filtração.

Através do estudo efectuado ao extracto a quente da madeira de cerejeira de acetona, através da técnica de cromatografia gasosa/espectrometria de massa (GC-MS), foi possível verificar que estes extractos possuíam maioritariamente ácidos gordos e açúcares, sendo os flavonóides um grupo de compostos presentes em muito pouca quantidade. Assim, foi realizada a extracção a frio da madeira de cerejeira, com o objectivo de se analisarem o tipo de compostos extraídos e verificar se os açúcares e os ácidos gordos não eram extraídos. Pela técnica de cromatografia em camada fina (c.c.f.) com os eluentes AcOEt:Ciclhex (2:1; 1:1) e CHCl_3 :MeOH (4:1), foi possível constatar que estes compostos ainda estavam presentes, apresentando-se com um R_f (factor de retenção) baixo.

A casca da madeira e os pés de cereja foram os que mostraram melhores rendimentos de extracção relativamente aos outros extractos e através da análise efectuada por c.c.f., com o eluente AcOEt:Ciclhex (2:1) foi possível verificar que os compostos maioritários presentes nos extractos possuíam grande polaridade. Deste modo, constatou-se que estes extractos

possuíam pouca quantidade de flavonóides agliconas, uma vez que estes são menos polares (Vinciguerra et al., 2003), apresentando maioritariamente açúcares livres e flavonóides na forma de glicósidos.

Comparando também os rendimentos de extracção da madeira de cerejeira com acetona (com extractor de Soxhlet), verificou-se que a madeira proveniente da árvore de cerejeira com mais idade obteve melhores resultados em termos de rendimento, tal como se pode observar na figura 18. Ao analisar por c.c.f. usando os eluentes AcOEt:Ciclhex (2:1; 1:1) e CHCl₃:MeOH (4:1), verifica-se que estes dois extractos possuem exactamente o mesmo número de compostos, no entanto, a madeira da árvore de cerejeira com mais idade exhibe um maior teor em compostos, apresentando por isso um rendimento de extracção maior que a madeira da árvore de cerejeira com menos idade.

Foi também realizada uma análise comparativa por c.c.f. dos extractos obtidos de acetona e acetato de etilo, com os eluentes AcOEt:Ciclhex (2:1; 1:1) e CHCl₃:MeOH (4:1). Deste modo, constatou-se que o extracto de acetona da madeira de cerejeira, extraído com o extractor de Soxhlet, possui um maior número de compostos flavonóides e não contém açúcares livres e flavonóides na forma de glicósidos em tanta quantidade, comparativamente com os restantes extractos. Deste modo, foi realizada a purificação e o isolamento dos compostos presentes no extracto da madeira de cerejeira com acetona, no entanto, determinou-se a actividade antioxidante de todos os extractos com acetona obtidos e do extracto da madeira com acetato de etilo, sendo possível comparar a actividade biológica de cada extracto.

2.3. Purificação do extracto da madeira de *Prunus avium*

O extracto com acetona da madeira proveniente da árvore de cerejeira com mais idade foi submetido a várias cromatografias em coluna (C.C.) em sílica gel, com o objectivo de isolar e purificar alguns compostos presentes neste extracto de acetona. Este possui um maior teor de compostos, relativamente ao extracto com acetona da madeira mais nova, contendo também maior número de compostos fenólicos que os extractos das várias partes da árvore de cerejeira (casca da madeira, folhas e pés de cereja).

Deste modo, realizou-se uma C.C. em sílica gel com os eluentes AcOEt:Ciclhex (1:1; 1:0) a partir do extracto da madeira com acetona (6,85g), onde se obtiveram as fracções I (2,004g; 29,26%) e II (1,695g; 24,74%). De seguida, procedeu-se à lavagem da coluna com metanol (MeOH), onde se obteve a fracção III (3,141g; 45,85%). Estas fracções (I, II e III) foram separadas de acordo com o R_f que apresentavam na placa de cromatografia, ou seja, a fracção I apresenta os compostos com o maior R_f e a fracção III possui compostos com o menor R_f , com os eluentes AcOEt:Ciclhex (2:1) e CHCl_3 :MeOH (4:1).

Foram realizadas diversas purificações a partir destas três fracções para tentar obter alguns compostos fenólicos existentes na espécie *Prunus avium*, no entanto, antes de serem realizadas estas purificações foi estudada a actividade antioxidante que cada fracção apresentava, sendo possível deste modo comparar as actividades antioxidantes obtidas com o tipo de compostos presentes em cada fracção.

A partir da fracção I (2,004g) foi realizada uma C.C. em sílica gel com os eluentes AcOEt:Ciclhex (1:5; 1:1; 1:0), onde se obtiveram as fracções A1 (0,040g; 0,58%); A2 (1,063g; 15,52%); A3 (0,410g; 5,99%) e A4 (0,480g; 7,01%).

A fracção A2 (1,063g) foi purificada por C.C., usando os eluentes AcOEt:Ciclhex (1:10; 1:7; 1:0), onde se obtiveram as fracções B1, B2, B3, B4 e B5. As fracções B2 e B3 correspondem a compostos puros, definidos como 1 (0,046g; 0,67%) e 2 (0,052g; 0,76%), respectivamente.

A purificação da fracção B4 (0,589g) com os eluentes AcOEt:Ciclhex (1:15; 1:10; 1:5; 1:1; 1:0) deu origem às fracções C1, C2 e C3. A fracção C2 (0,453g) foi submetida a uma nova C.C. com o eluente CHCl_3 :MeOH (99:1), onde se obtiveram as fracções D1, D2 e D3. As fracções D2 e D3 correspondem a compostos puros definidos como 3 (0,074g; 1,08%) e 4 (0,110g; 1,60%).

A fracção B5 (0,326g) foi também submetida a uma purificação por C.C. com os eluentes CHCl_3 e CHCl_3 :MeOH (95:5), onde se obtiveram as fracções E1, E2, E3 e E4, correspondendo a fracção E2 a um composto puro definido como 5 (0,081g; 1,18%).

A fracção A4 (0,480g) foi purificada por C.C., usando os AcOEt:Ciclhex (1:10; 1:8; 1:7; 1:6; 1:1; 1:0), dando origem às fracções F1, F2, F3, F4, F5 e F6. As fracções F2, F4 e F6 correspondem a compostos puros definidos como **6** (0,164g; 2,40%), **7** (0,075g; 1,10%) e **8** (0,055g; 0,80%).

A purificação da fracção II (1,695g) por C.C. com os eluentes CHCl₃:MeOH (15:1) e MeOH originou as fracções G1, G2 e G3. A fracção G2 (0,623g) foi submetida a uma nova C.C. usando os eluentes CHCl₃:MeOH (20:1) e MeOH, dando origem à fracção H1, H2 e H3, correspondendo a fracção H2 a um composto puro, definido como **9** (0,259g; 3,78%).

Por fim, foi realizada a purificação da fracção III (3,141g) com os eluentes CHCl₃:MeOH (20:1; 10:1) e MeOH, obtendo-se as fracções I1, I2, I3, I4 e I5. A fracção I4 corresponde a um composto puro, definido como **10** (0,136g; 1,99%).

A figura 19 apresenta o organograma das cromatografias em coluna realizadas ao extracto da madeira de cerejeira com acetona, as fracções e os respectivos produtos puros obtidos.

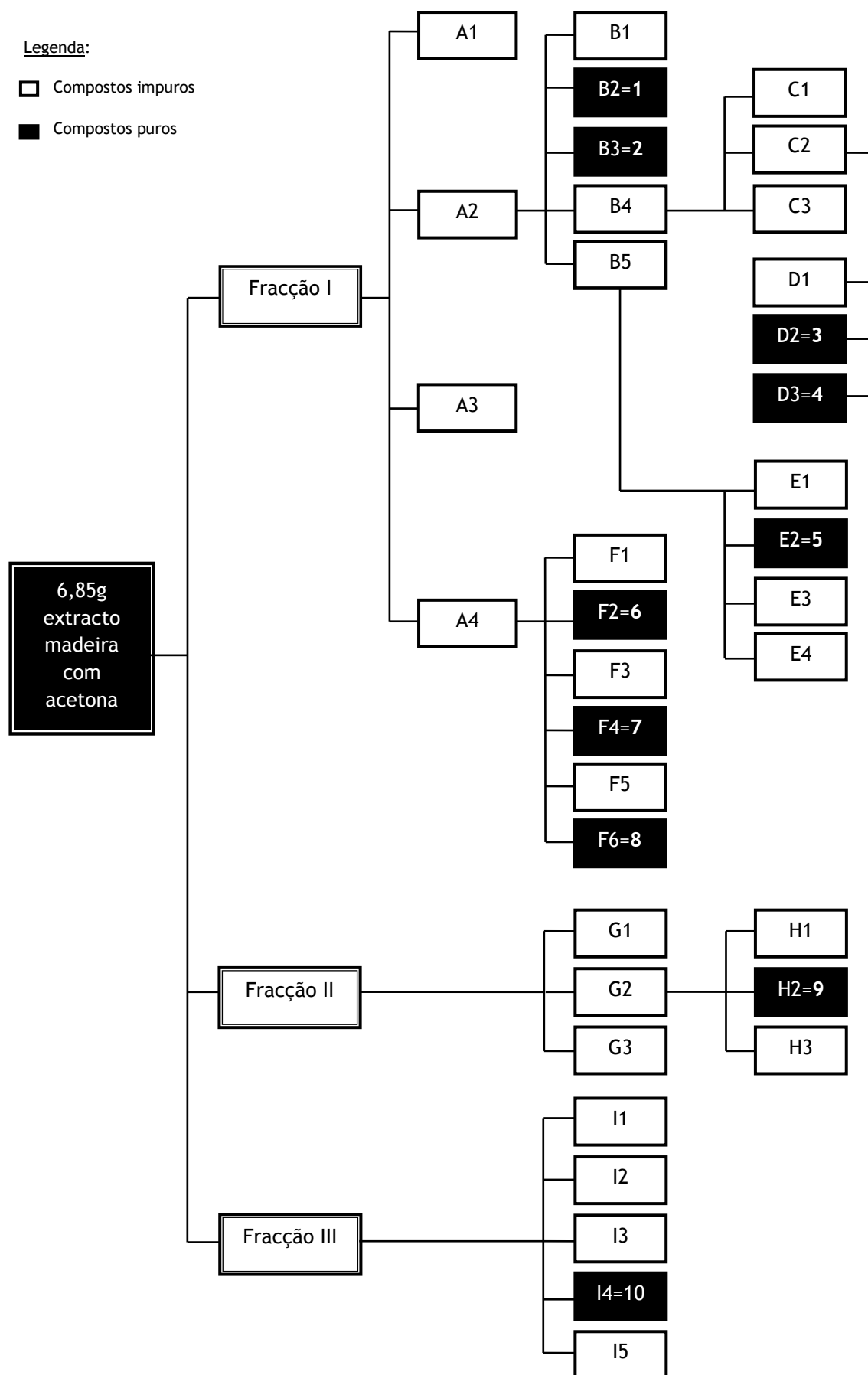


Figura 19 - Organograma do fraccionamento do extracto da madeira de cerejeira com acetona.

A figura 20 apresenta uma análise quantitativa dos compostos puros obtidos da purificação do extracto de acetona da madeira de cerejeira.

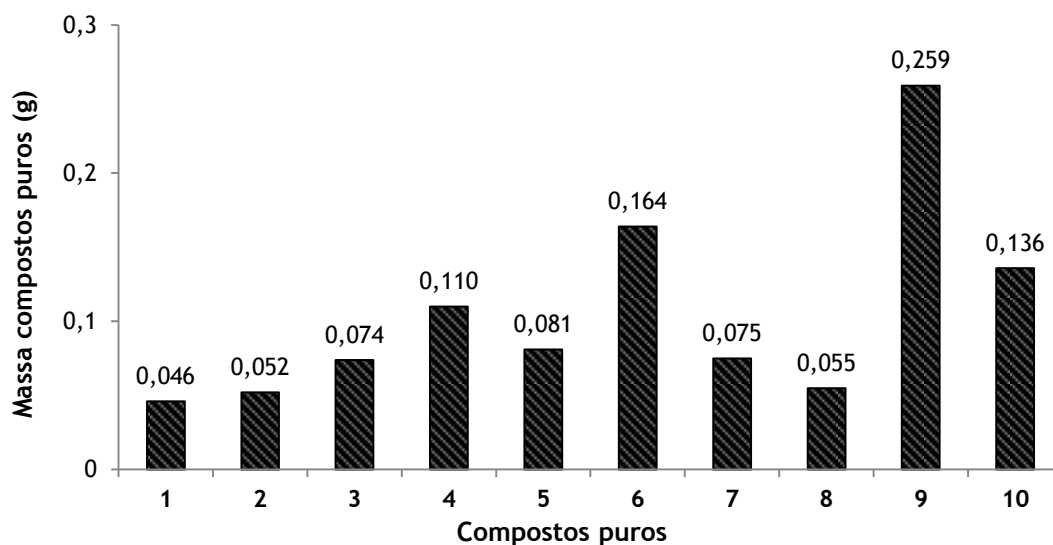


Figura 20 - Quantidade de compostos puros obtidos a partir de 100g de extracto bruto da madeira de cerejeira.

Em suma, através das várias purificações realizadas através da técnica de cromatografia em coluna ao extracto de acetona da madeira de *Prunus avium* (6,85g), foram obtidos diversos compostos puros nas respectivas quantidades: 1 (46 mg; 0,67%), 2 (52 mg; 0,76%), 3 (74 mg; 1,08%), 4 (110 mg; 1,60%), 5 (81 mg; 1,18%), 6 (164 mg; 2,40%), 7 (75 mg; 1,10%), 8 (55 mg; 0,80%), 9 (259 mg; 3,78%) e 10 (136 mg; 1,99%).

Como se pode verificar pelos resultados obtidos, a quantidade de flavonóides isolados e purificados é pequena, uma vez que o extracto da madeira de cerejeira contém açúcares na sua maioria, tal como já foi referido anteriormente através do estudo realizado com a técnica de GC-MS, no entanto, torna-se aliciente a purificação destes compostos, uma vez que são estes que potenciam a actividade biológica da cerejeira, conferindo-lhe os mais diversos efeitos benéficos para a saúde humana.

2.4. Análise e identificação dos compostos isolados

2.4.1. Considerações gerais

Qualquer estudo realizado na área de Química Orgânica, exige fundamentalmente isolar, identificar e caracterizar a estrutura molecular dos compostos obtidos. Neste trabalho, os compostos puros, definidos de **1** a **10**, obtidos a partir das diversas purificações realizadas ao extracto da madeira de cerejeira com acetona, foram também caracterizados estruturalmente por espectroscopia de ressonância magnética nuclear de protão (^1H -RMN), de carbono (^{13}C -RMN) e também por técnicas bidimensionais de ressonância magnética nuclear (RMN-2D), bem como por espectroscopia de infravermelho (I.V.).

Todas as estruturas propostas para os compostos isolados do extracto de *Prunus avium*, foram comparadas com as estruturas propostas pelo nosso grupo de trabalho (Lopes, 2007), bem como pelos dados espectroscópicos presentes na literatura (Céliz, Daz, 2011; González-Gómez et al., 2010; Serra et al., 2010; McNulty et al., 2009; Gonçalves, 2006; Vinciguerra et al., 2003; Wang et al., 1999).

2.4.2. Caracterização estrutural de flavanonas

Através dos dados espectroscópicos de RMN e I.V. obtidos para os compostos **1**, **3** a **6**, **8** e **10**, foi possível verificar que estes compostos pertenciam ao grupo das flavanonas. Nos espectros de I.V. destes compostos verificou-se o aparecimento de bandas de vibração, características das ligações OH, que variaram de 3035 a 3330 cm^{-1} . Observou-se ainda o aparecimento de bandas fortes devidas à vibração do grupo carbonilo presente no anel C a 1627-1640 cm^{-1} .

A análise espectroscópica permitiu identificar estes compostos como **1-Pinostrobin** (5-hidroxi-7-metoxiflavanona), **3-Dihidrowogonina** (5,7-dihidroxi-8-metoxiflavanona), **4-Pinocembrina** (5,7-dihidroxi-flavanona), **5-Sakuranetina** (4',5-dihidroxi-7-metoxiflavanona), **6-Naringenina** (4',5,7-trihidroxi-flavanona), **8-Dihidrocanferol** (3,4',5,7-tetrahidroxiflavanona) e **10-Prunina** (4',5-dihidroxiflavanona-7-O-glucose). A figura 21 apresenta a estrutura química deste grupo de compostos isolados.

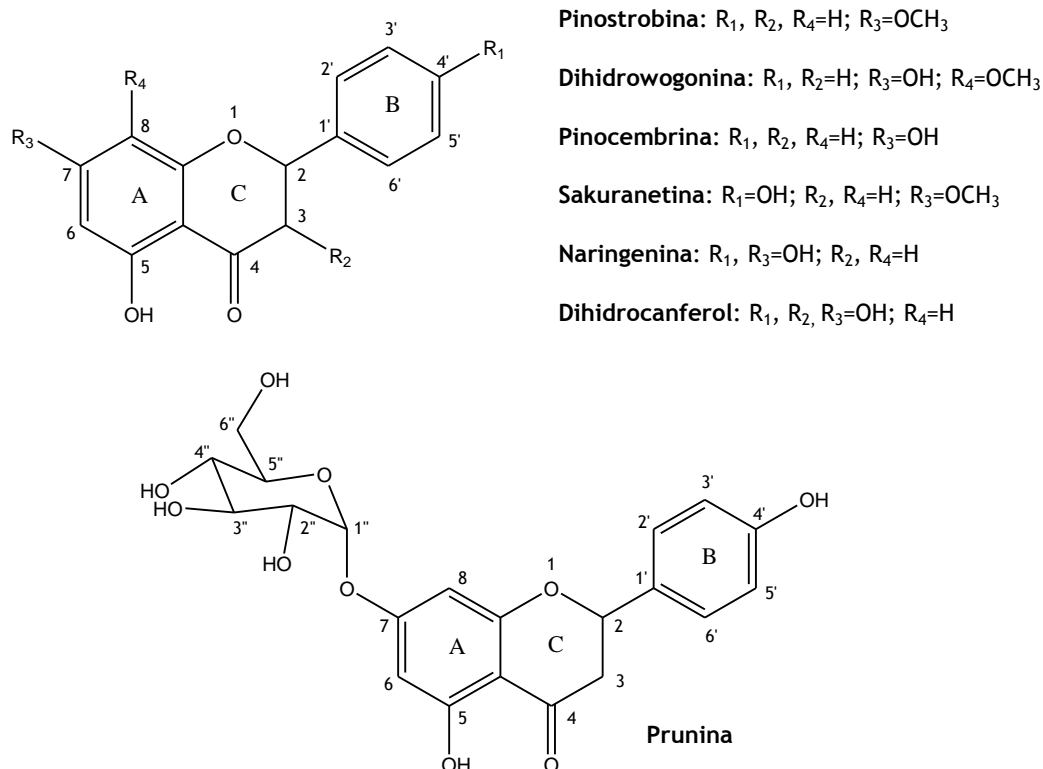


Figura 21 - Estrutura química dos compostos isolados e purificados da espécie *Prunus avium* pertencentes ao grupo das flavanonas.

Os compostos **1-Pinostrobrina**, **3-Dihidrowogonina** e **4-Pinocembrina** apresentam sinais espectroscópicos muito semelhantes. Ambos os compostos não possuem no anel B e C grupos OH, sendo por isso os desvios químicos dos espectros de 1H -RMN e ^{13}C -RMN muito parecidos, no entanto, pela análise dos espectros verifica-se que existem pequenas diferenças que permitem a confirmação das estruturas propostas.

O composto **1-Pinostrobrina** apresentou no espectro de 1H -RMN um sinal a δ 12,13 como singuleto relativo ao grupo OH-5, enquanto os sinais do anel B surgiram num multipletto δ 7,59-7,39 com 5 protões. A δ 6,09 e a δ 6,06 foram detectados dois dupletos com $J=2,0$ Hz, correspondentes aos H-6 e H-8 do anel A, respectivamente. A δ 5,60 surgiu um duplo dupletto com $J=12,8$ Hz e $J=3,0$ Hz, correspondente ao H-2 do anel C. A existência de um sinal a δ 3,85 como singuleto com 3 protões, corresponde à presença de um grupo metoxilo na posição 7 do anel A. O grupo CH_2 na posição 3 do anel C apresentava dois duplos dupletos a δ 3,20 ($J_{3a,2}=12,8$ Hz e $J_{3a,3b}=17,0$ Hz) e δ 2,80 ($J_{3b,2}=3,0$ Hz e $J_{3b,3a}=17,0$ Hz). O espectro de ^{13}C -RMN apresentou um sinal a δ 197,68 relativo a C-4 e os sinais a δ 168,87, δ 165,02 e δ 164,21, relativos a C-5, C-7 e C-9, respectivamente. Os sinais do anel B surgiram a δ 130,66 para C-1' e a δ 129,09-127,28 para os restantes carbonos do anel. A δ 103,76 foi detectado o sinal relativo a C-10 e a δ 95,49 e δ 94,59, apresentaram-se os sinais de C-6 e C-8,

respectivamente. O sinal de C-2 surgiu a δ 80,06 como CH e o sinal de OCH₃-7 apareceu a δ 56,27 como CH₃. Por último, verificou-se a δ 43,50 o sinal C-3 como CH₂.

Por comparação dos espectros do composto **3-Dihidrowogonina** com os do composto **1-Pinostrobina** verifica-se que a principal diferença é a existência no espectro de ¹H-RMN, de um sinal a δ 9,25 como singuleto com um próton, correspondente à existência de um grupo OH na posição 7 do anel A. Por outro lado, observou-se também a existência de um sinal a δ 3,74 como singuleto com 3 prótons, que corresponde à presença de um grupo metoxilo na posição 8 do anel A, uma vez que o sinal que corresponde ao H-6 se apresenta como singuleto a δ 6,01. No espectro de ¹³C-RMN verificou-se a existência de um sinal de C-8 a δ 155,07 relativo a um carbono quaternário e o sinal de OCH₃-8 apareceu a δ 61,37 como CH₃.

Comparando também os espectros de ¹H-RMN e ¹³C-RMN do composto **4-Pinocembrina** com os dos compostos **1-Pinostrobina** e **3-Dihidrowogonina**, constatou-se que este composto apresentava no espectro de ¹H-RMN um sinal a δ 9,83 como singuleto com um próton, relativo à existência de um grupo OH na posição 7 do anel A, tal como o composto **3-Dihidrowogonina**, no entanto, verificou-se que não existia nenhum grupo substituinte nas posições H-6 e H-8 deste anel, uma vez que a δ 6,00 e a δ 5,87 foram detectados dois dupletos com $J=2,00$ Hz, correspondentes a estes dois prótons (H-6 e H-8). No espectro de ¹³C-RMN observou-se que existiam dois sinais a δ 96,98 e δ 95,94, correspondentes a C-6 e C-8, respectivamente, tal como acontece com o composto **1-Pinostrobina** mas não com o composto **3-Dihidrowogonina**.

A tabela 4 apresenta os dados espectroscópicos mais relevantes encontrados nos espectros de ¹H-RMN e ¹³C-RMN dos compostos **1**, **3** e **4** para confirmação das estruturas propostas.

Tabela 4 - Desvios químicos (δ em ppm) dos sinais nos espectros de ^1H -RMN e ^{13}C -RMN, bem como a multiplicidade dos sinais (m) e as constantes de acoplamento (J em Hz) para os compostos **1**, **3** e **4**.

		Anel A	
		Posição	
		7	8
1-Pinostrobrina ($\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{O}_4$)	δ ^1H (ppm); m; J (Hz)	3,85; s	6,06; d; 2,00
	δ ^{13}C (ppm)	165,02 (C); 56,27 (OCH_3)	94,59 (CH)
3-Dihidrowogonina ($\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{O}_5$)	δ ^1H (ppm); m; J (Hz)	9,25; s	3,74; s
	δ ^{13}C (ppm)	160,51 (C)	155,07 (C); 61,37 (OCH_3)
4-Pinocembrina ($\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{O}_4$)	δ ^1H (ppm); m; J (Hz)	9,83; s	5,97; d; 2,00
	δ ^{13}C (ppm)	165,32 (C)	95,94 (CH)

s: singuleto; d: duplete

Os compostos **5-Sakuranetina**, **6-Naringenina**, **8-Dihidrocanferol** e **10-Prunina** também apresentam sinais espectroscópicos muito semelhantes. Ambos os compostos possuem um grupo hidroxilo na posição 4' do anel B, apresentando este anel sinais diferentes nos espectros de ^1H -RMN e ^{13}C -RMN dos compostos caracterizados anteriormente. Por outro lado, por comparação dos espectros destes compostos é possível observar algumas diferenças que permitem a confirmação das estruturas propostas.

Pela análise do espectro de ^1H -RMN do composto **5-Sakuranetina** verificou-se que o sinal relativo ao grupo OH-5 do anel A surgiu num singuleto a δ 12,14, enquanto o sinal do grupo OH-4' presente no anel B surgiu num singuleto a δ 8,64. A δ 7,39 e a δ 6,90 foram detectados dois dupletos com $J=8,10$ Hz, correspondentes aos H-2'=H-6' e H-3'=H-5' do anel B, respectivamente. A δ 6,03 foi detectado um singuleto com dois prótons, correspondentes aos sinais dos H-6 e H-8 do anel A. O sinal relativo de H-2 surgiu a δ 5,47 como duplo duplete com $J=3,0$ Hz e $J=12,4$ Hz. A existência de um sinal a δ 3,84 como singuleto com 3 prótons corresponde à presença de um grupo metoxilo na posição 7 do anel A. O grupo CH_2 na posição 3 do anel C apresentou dois duplos dupletos a δ 3,20 ($J_{3a,2}=12,4$ Hz e $J_{3a,3b}=17,0$ Hz) e δ 2,75 ($J_{3b,2}=3,0$ Hz e $J_{3b,3a}=17,0$ Hz). O espectro de ^{13}C -RMN apresentou um sinal a δ 197,66 relativo a C-4 e os sinais a δ 168,85, δ 165 e δ 164,20, relativos a C-5, C-7 e C-9, respectivamente. O sinal do OH-4' surgiu a δ 158,77 e os restantes sinais do anel B surgiram a δ 130,63 para C-1', a δ 129,08 para C-2' e C-6' e a δ 116,22 para C-3' e C-5'. A δ 103,74 foi detectado o sinal relativo a C-10 e a δ 95,49 e δ 94,59, apresentaram-se os sinais de C-6 e C-8,

respectivamente. O sinal de C-2 surgiu a δ 80,05 como CH e o sinal de OCH₃-7 apareceu a δ 56,25 como CH₃. Por último, verificou-se a δ 43,49 o sinal de C-3 como CH₂.

Comparando os sinais espectroscópicos do composto **6-Naringenina** e do composto **5-Sakuranetina**, verifica-se que a única diferença que existe é que o composto **6-Naringenina** apresenta um grupo hidroxilo OH-7 no anel A, em vez de um grupo metoxilo nesta posição. Deste modo, no espectro de ¹H-RMN deste composto observa-se a existência de um sinal a δ 9,69 como singuleto, correspondente ao grupo OH na posição 7 do anel A. Por outro lado, no espectro de ¹³C-RMN não se observou a existência de nenhum grupo metoxilo, confirmando a estrutura proposta para este composto.

O composto **8-Dihidrocanferol** apresenta também dados espectroscópicos muito semelhantes aos dos outros compostos, mas o composto **6-Naringenina** é o que apresenta mais semelhanças. O composto **8-Dihidrocanferol** apresenta somente mais um grupo hidroxilo, que se situa na posição 3 do anel C. Este grupo OH-3 apresenta-se no espectro de ¹H-RMN a δ 3,24 como singuleto com um protão. O sinal de H-3 também mudou, situando-se assim a δ 4,69 como duplete com $J=11,53$ Hz. No espectro de ¹³C-RMN verificou-se a δ 73,14 o sinal de C-3 como CH.

A flavanona glicosídica definida como **10-Prunina**, também denominada de Naringenina-7-O-glucósido apresenta dados espectroscópicos muito semelhantes aos dos compostos **5-Sakuranetina** e **6-Naringenina**, pois possui dois grupos hidroxilo situados nas posições H-4' e H-5, no entanto, os seus espectros de RMN apresentam uma série de sinais que evidenciam a presença de uma molécula de açúcar (glucose) ligada à posição 7 do anel A, caso que não acontece com os restantes compostos. No espectro de ¹H-RMN verifica-se a existência de um sinal a δ 5,07 de um duplete com um $J=7,68$ Hz, correspondente a H-1'' da molécula de glucose. A δ 4,75 surgiu um duplete com $J=3,42$ Hz e a δ 4,40 surgiu um multiplete, correspondentes aos sinais de H-6b'' e H-6a'', respectivamente. Os sinais que se situam a δ 3,88-3,45 com 4 protões correspondem ao H-2'', H-3'', H-4'' e H-5''. O espectro de ¹³C-RMN apresentou um sinal a δ 166,72 relativo a C-7, que sugere que a molécula de açúcar está ligada a esta posição através de uma ligação glicosídica. A δ 101,01 foi detectado o sinal de C-1'' e a δ 77,87, δ 77,72, δ 74,46 e δ 71,03 surgiram os sinais de C-3'', C-5'', C-2'' e C-4'', respectivamente. Por último, verificou-se a δ 62,45 o sinal de C-6'' como CH₂ da molécula de glucose.

A tabela 5 apresenta os dados espectroscópicos mais relevantes encontrados nos espectros de ¹H-RMN e ¹³C-RMN dos compostos **5**, **6**, **8** e **10** para confirmação das estruturas propostas.

Tabela 5 - Desvios químicos (δ em ppm) dos sinais nos espectros de ^1H -RMN e ^{13}C -RMN, bem como a multiplicidade dos sinais (m) e as constantes de acoplamento (J em Hz) para os compostos **5**, **6**, **8** e **10**.

	Posição	Anel A	Anel B	Anel C	
		7	4'	3a	3b
5-Sakuranetina ($\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{O}_5$)	δ ^1H (ppm); m; J (Hz)	3,84; s	8,64; s	3,20; dd; 12,40; 17,00	2,75; dd; 3,00; 17,00
	δ ^{13}C (ppm)	165,00 (C); 56,25 (OCH_3)	158,78 (CH)	43,49 (CH_2)	
6-Naringenina ($\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{O}_5$)	δ ^1H (ppm); m; J (Hz)	9,69; s	8,56; s	3,20; dd; 12,80; 17,00	2,75; dd; 3,00; 17,00
	δ ^{13}C (ppm)	167,48 (C)	158,79 (C)	43,56 (CH_2)	
8-Dihidrocanferol ($\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{O}_6$)	δ ^1H (ppm); m; J (Hz)	11,72; s	8,98; s	4,69; d; 12,00	3,24; s
	δ ^{13}C (ppm)	167,85 (C)	158,85 (C)	73,14 (CH)	
10-Prunina ($\text{C}_{21}\text{H}_{23}\text{O}_{10}$)	δ ^1H (ppm); m; J (Hz)	—	8,65	3,24; dd; 12,80; 17,00	2,76; dd; 3,00; 17,00
	δ ^{13}C (ppm)	166,71 (C)	158,88 (C)	43,54 (CH_2)	

s: singuleto; d: duplete; dd: duplo duplete

2.4.3. Caracterização estrutural de flavonas e isoflavonas

Os dados espectroscópicos de RMN e I.V. obtidos para os compostos **2** e **7**, permitiram classificar o composto **2** como uma flavona e o composto **7** como uma isoflavona. Nos espectros de I.V. destes compostos verificou-se o aparecimento de bandas de vibração, características das ligações OH, que variaram de $3200\text{--}3102\text{ cm}^{-1}$. Observou-se ainda o aparecimento de bandas fortes devidas à vibração da ligação carbono-oxigênio do grupo carbonilo a 1610 e 1607 cm^{-1} e bandas relativas à ligação $\text{C}=\text{C}$ a 1500 e 1493 cm^{-1} .

A análise espectroscópica permitiu identificar estes compostos como **2-Tectocrisina** (5-hidroxi-7-metoxiflavona) e **7-Genisteína** (4',5,7-trihidroxi-isoflavona). A figura 22 apresenta a estrutura química destes grupos de compostos isolados.

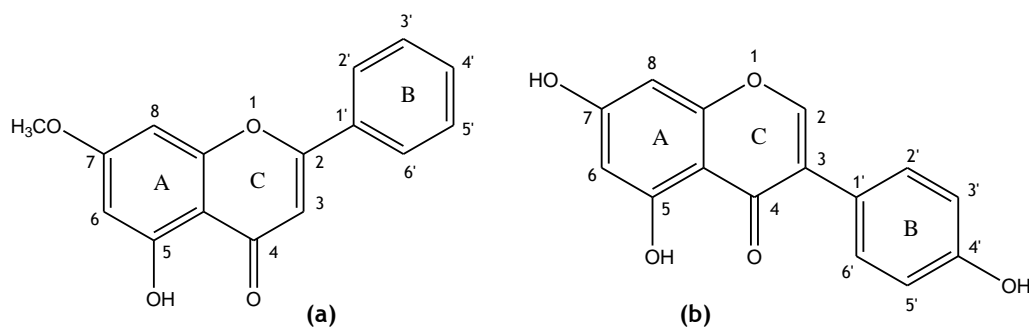


Figura 22 - Estrutura química dos compostos isolados e purificados da espécie *Prunus avium* pertencentes ao grupo das flavonas e isoflavonas: **(a)** Tectocrisina e **(b)** Genisteína.

Comparando os espectros de ^1H -RMN e ^{13}C -RMN dos compostos **2-Tectocrisina** e **7-Genisteína**, verifica-se que ambos possuem uma ligação dupla entre C2 e C3, uma vez que os desvios químicos destas posições são diferentes dos mencionados anteriormente, no entanto, verifica-se que existem pequenas diferenças nos espectros de RMN que permitem classificar estes compostos de forma diferente, pertencendo o composto **2-Tectocrisina** ao grupo das flavonas e o composto **7-Genisteína** ao grupo das isoflavonas, uma vez que este apresenta o anel B ligado à posição 3 do anel C.

O composto **2-Tectocrisina** apresentou no espectro de ^1H -RMN um sinal relativo a δ 11,88 como singuleto relativo ao grupo OH-5. A δ 8,11-8,07 com 2 prótons e a δ 7,63-7,60 com 3 prótons foram detectados dois multipletos, correspondentes aos sinais de $\text{H}-2'=\text{H}-6'$ e $\text{H}-3'=\text{H}-4'=\text{H}-5'$, respectivamente. A δ 6,84 surgiu como singuleto um sinal relativo a H-3 e a δ 6,74 e δ 6,35 foram detectados dois dupletos com $J=2,15$ Hz, que correspondem aos H-6 e H-8 do anel A, respectivamente. A existência de um sinal a δ 3,94 como singuleto com 3 prótons corresponde à presença de um grupo metoxilo na posição 7 do anel A. O espectro de ^{13}C -RMN apresentou um sinal a δ 183,35 relativo a C-4 e os sinais a δ 166,87, δ 164,95 e δ 163,11, relativos a C-7, C-5 e C-9, respectivamente. Detectou-se um sinal a δ 158,88 para C-2 e um sinal a δ 132,90 relativo a C-4'. A δ 132,22 surgiu o sinal para C-1' e a δ 130,07 e δ 127,35 foram detectados os sinais para os restantes carbonos do anel B. A δ 118,93 foi encontrado o sinal de C-10 e a δ 106,33 como CH apresentou-se o sinal de C-3. A δ 98,96 e δ 93,43 foram detectados os sinais de C-6 e C-8, respectivamente. Por último, apareceu a δ 56,54 como CH_3 o sinal de OCH_3 -7.

Apesar dos compostos **2-Tectocrisina** e **7-Genisteína** pertencerem a diferentes grupos de flavonóides, existem outras diferenças entre estes compostos. O composto **7-Genisteína** apresenta mais dois grupos hidroxilo que o composto **2-Tectocrisina**, que se situam nas posições 7 e 4' dos anéis A e B, respectivamente. Deste modo, no espectro de ^1H -RMN deste composto observa-se a existência de um sinal a δ 9,76 e a δ 8,58 como singuletos, que correspondem aos grupos OH-7 e OH-4', respectivamente. Foi também detectado um sinal a δ

8,16 como singuleto que correspondente a H-2, não sendo detectado o sinal de H-3. No espectro de ^{13}C -RMN verificou-se a existência de um sinal a δ 165,10 e a δ 159,11 relativos aos carbonos quaternários C-7 e C-4'. A δ 154,38 foi encontrado o sinal de C-2 como CH e a δ 124,08 apresentou-se o sinal de C-3 relativo a um carbono quaternário, confirmando-se assim a estrutura proposta para este composto.

A tabela 6 apresenta os dados espectroscópicos mais relevantes encontrados nos espectros de ^1H -RMN e ^{13}C -RMN dos compostos **2** e **7** que possibilitam confirmar as estruturas propostas.

Tabela 6 - Desvios químicos (δ em ppm) dos sinais nos espectros de ^1H -RMN e ^{13}C -RMN, bem como a multiplicidade dos sinais (m) e as constantes de acoplamento (J em Hz) para os compostos **2** e **7**.

	Posição	Anel A	Anel B	Anel C	
		7	4'	2	3
2-Tectocrisina ($\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_4$)	δ ^1H (ppm); m; J (Hz)	3,94, s	7,63-7,60; m	—	6,84; s
	δ ^{13}C (ppm)	166,87 (C); 56,54 (CH_3)	132,90 (CH)	158,88 (C)	106,33 (CH)
7-Genisteína ($\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_5$)	δ ^1H (ppm); m; J (Hz)	9,76; s	8,58; s	8,16; s	—
	δ ^{13}C (ppm)	165,10 (C)	159,11 (C)	154,38 (CH)	124,08 (C)

s: singuleto; m: multiplete

2.4.4. Caracterização estrutural de flavanóis

Através das análises efectuadas por espectroscopia de ^1H -RMN e ^{13}C -RMN e por RMN-2D, usando correlações heteronucleares próton-carbono a uma ligação (HSQC), bem como por espectroscopia de I.V., foi possível verificar que o composto **9** pertence ao grupo dos flavanóis, sendo identificado como **catequina** (3',4'-dihidroxifenil-croman-3,5,7-triol) (figura 23). Os sinais espectroscópicos obtidos permitem diferenciar este composto da epicatequina, uma vez que sugerem que o composto **9**-catequina apresenta um grupo OH na posição 3 do anel C orientado para a frente.

Ao observar o espectro de I.V. deste composto detectou-se o aparecimento de uma banda característica da vibração da ligação OH a 3284 cm^{-1} , não tendo sido observada nenhuma banda forte do grupo carbonilo.

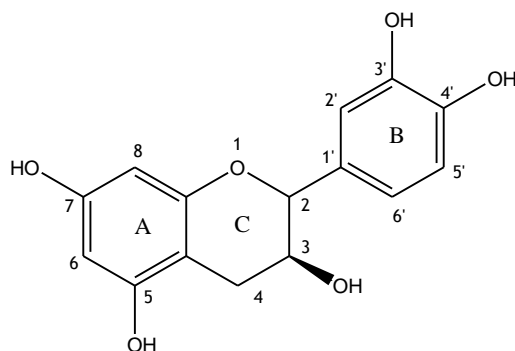


Figura 23 - Estrutura química da catequina isolada e purificada de *Prunus avium*.

No espectro de ^1H -RMN deste composto observaram-se três sinais a δ 6,92 (1H, d, $J=2,0$ Hz), δ 6,82 (1H, d, $J=8,10$ Hz) e δ 6,77 (1H, dd, $J_{6',2'}=2,0$ Hz, $J_{6',5'}=8,10$ Hz) relativos aos sinais de H-2', H-5' e H-6' do anel B, respectivamente. A δ 6,05 e a δ 5,90 foram detectados dois dupletos com $J=2,10$ Hz que correspondem a H-6 e H-8 do anel A, respectivamente. Observou-se um duplete a δ 4,59 com $J=7,83$ Hz relativo a H-2 e um multiplete a δ 4,02 que corresponde ao sinal de H-3. O grupo CH_2 na posição 4 do anel C apresentou dois duplos dupletos a δ 2,94 ($J=5,54$ Hz e $J_{4a,4b}=16,10$ Hz) e δ 2,56 ($J=8,51$ Hz e $J_{4b,4a}=16,10$ Hz).

A análise do espectro de ^{13}C -RMN em conjunto com o espectro de RMN-2D, usando a técnica HSQC, permitiu atribuir os quinze sinais observados aos quinze carbonos da estrutura da **9-catequina**. Observaram-se três sinais a δ 157,57, δ 157,07 e δ 156,74 relativos aos carbonos quaternários C-7, C-5 e C-9, respectivamente. Detectou-se um sinal a δ 145,55 para C-3' e um sinal a δ 145,49 relativo a C-4'. A δ 132,01 surgiu o sinal para C-1' e a δ 119,97, δ 115,60 e δ 115,11 foram detectados os sinais para os restantes carbonos do anel B. A δ 100,49 foi encontrado o sinal de C-10 e a δ 95,99 e δ 95,29 observaram-se os sinais de C-6 e C-8, respectivamente. Surgiram como CH os sinais a δ 82,55 (C-2) e δ 68,20 (C-3), e por último, o grupo CH_2 na posição 4 do anel C detectou-se a δ 28,67.

A análise do espectro HSQC foi importante para atribuir, com precisão, os sinais a δ 119,97, δ 115,60 e δ 115,11 aos carbonos C-6', C-5' e C-2', respectivamente, visto que mostraram correlações 1J com os sinais a δ 6,92, δ 6,82 e δ 6,77, os quais foram atribuídos, respectivamente, aos prótons H-2', H-5' e H-6'. Esta análise também permitiu atribuir os sinais a δ 95,99 ao carbono C-6 e δ 95,29 ao carbono C-8, pois mostraram correlações com os sinais a δ 6,06 e δ 5,90 que correspondem aos prótons H-6 e H-8.

2.5. Determinação da actividade antioxidante

A avaliação quantitativa da actividade antioxidante foi realizada segundo o método do radical livre DPPH, seguindo a metodologia descrita na literatura (Sánchez-Moreno et al., 1998; Brand-Williams et al., 1995). Este método é baseado na captura do radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazilo) por antioxidantes, produzindo uma diminuição da absorvência a 515 nm de soluções metanólicas com diferentes concentrações. A leitura das medidas de absorvência das soluções diluídas em metanol foi realizada de minuto a minuto até completar 1h, sendo os ensaios realizados em triplicado.

Determinou-se a actividade antioxidante de vários extractos de *Prunus avium*, tais como a madeira, as folhas, a casca da madeira, os pés de cereja e a madeira com AcoEt e acetona a frio. A partir da primeira cromatografia realizada ao extracto da madeira de cerejeira com acetona foram obtidas as fracções I, II e III. Estas fracções foram separadas de acordo com o R_f que apresentavam, tal como já foi mencionado anteriormente, sendo posteriormente avaliada quantitativamente a actividade antioxidante destas fracções. Através da análise cromatográfica em camada fina (c.c.f.) foi também possível verificar que a fracção I contém os compostos isolados definidos de 1 a 8 (Pinostrobin, Tectocristina, Dihidrowogonina, Pinocembrina, Sakuranetina, Naringenina, Genisteína e Dihidrocanferol), a fracção II contém o composto definido como 9 (Catequina) e fracção III possui o composto 10 (Prunina), para além de muitos outros compostos que não foram isolados.

Foi também determinada a actividade antioxidante do composto catequina isoladamente, obtido a partir das purificações realizadas ao extracto da madeira de cerejeira com acetona. Para validação dos resultados obtidos através do método do radical DPPH, utilizou-se como referência um antioxidante conhecido definido como quercetina.

Através da metodologia seguida foi possível avaliar o comportamento cinético da reacção do radical DPPH com cada amostra estudada, uma vez que é controlada a diminuição da absorvência das misturas reacionais ao longo do tempo (máximo 60 minutos). A figura 24 apresenta graficamente o comportamento cinético das várias amostras, na concentração de 100 µg/mL, com o radical livre DPPH, através da curva da percentagem de DPPH remanescente (%DPPH_{REM}) em função do tempo (minutos).

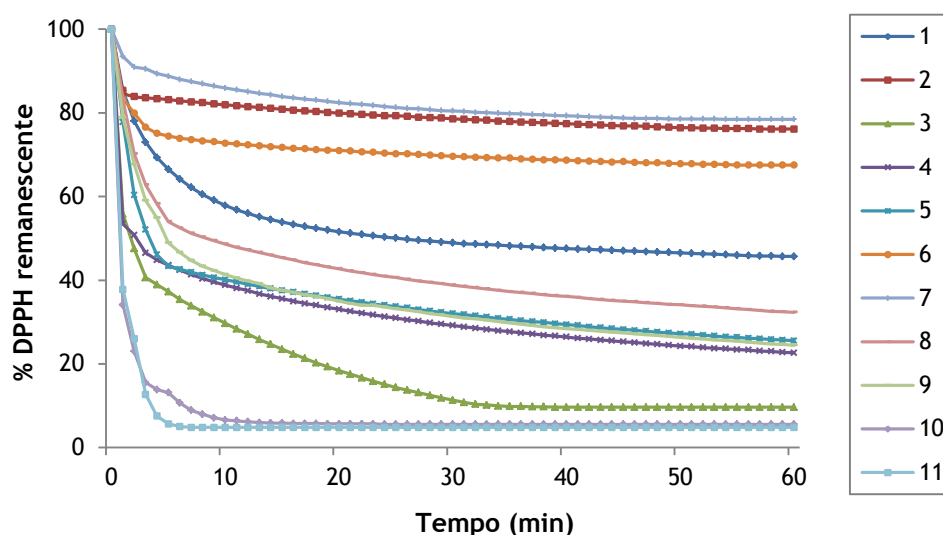


Figura 24 - Comportamento cinético das várias amostras estudadas relativamente ao radical DPPH.

1. Extracto da madeira com acetona; 2. Fracção I; 3. Fracção II; 4. Fracção III; 5. Extracto dos pés com acetona ; 6. Extracto da casca com acetona; 7. Extracto das folhas com acetona; 8. Extracto da madeira com AcoEt a frio; 9. Extracto da madeira com acetona a frio; 10. Catequina; 11. Quercetina.

A evolução da cinética da reacção depende da natureza dos diferentes tipos de antioxidantes testados. De acordo com a literatura (Sánchez-Moreno et al., 1998; Brand-Williams et al., 1995) podem ser observados três tipos de comportamentos cinéticos, baseando-se esta classificação no tempo que a mistura reaccional demora a atingir o estado de equilíbrio: rápido (<5 min), intermédio (5-30 min) e lento (>30 min).

Podemos observar pelo gráfico apresentado na figura 24, que todas as amostras estudadas apresentaram uma cinética lenta, à excepção do composto catequina que exibiu um comportamento cinético intermédio, podendo ser comparado com o composto quercetina (referência). No entanto, tanto a catequina, como a Fracção II e III (do extracto da madeira de cerejeira com acetona), o extracto dos pés de cereja e o extracto da madeira com acetona a frio, atingiram praticamente o máximo de consumo de DPPH em menos de 5 minutos, com uma percentagem de DPPH remanescente menor que 50%, demonstrando um consumo significativo de DPPH ao longo do tempo.

A concentração eficiente de cada amostra estudada, quantidade de antioxidante necessário para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50% (Efficient Concentration= EC_{50}), foi determinada através de uma curva exponencial (Anexo II), obtida a partir da percentagem de DPPH remanescente em função das diferentes concentrações testadas. Estes valores de DPPH remanescentes foram calculados a partir da equação da curva de calibração do radical DPPH e dos valores de absorvência no estado estacionário. Neste caso, como existem diferentes tipos de comportamentos cinéticos, foi determinado o valor do EC_{50} após 60 minutos de reacção (tabela 7), sendo este considerado o estado estacionário para todas as amostras. Para os compostos que reagiram rapidamente com o radical DPPH não existe nenhuma diferença no

valor do EC_{50} após 30 minutos ou 60 minutos de reacção, no entanto, os compostos que apresentaram uma cinética lenta só ao fim de 60 minutos de reacção é que a absorvência começou a estabilizar, não sendo por isso correcto calcular o valor do EC_{50} antes de se completar 1h de reacção.

Tabela 7 - Valores da quantidade de antioxidante necessário para diminuir em 50% a concentração inicial de DPPH (EC_{50}) de cada amostra estudada.

Amostras	$EC_{50} \pm DP$ ($\mu g/mL$) ^a
1. Extracto da madeira com acetona	97,64 \pm 1,38
2. Fracção I	481,37 \pm 3,34
3. Fracção II	40,55 \pm 0,08
4. Fracção III	44,09 \pm 0,27
5. Extracto dos pés de cereja com acetona	48,91 \pm 0,44
6. Extracto da casca com acetona	128,68 \pm 0,96
7. Extracto das folhas com acetona	461,11 \pm 4,67
8. Extracto da madeira com AcOEt a frio	55,73 \pm 0,15
9. Extracto da madeira com acetona a frio	48,31 \pm 0,13
10. Catequina	35,44 \pm 0,09
11. Quercetina	32,98 \pm 0,10

^aCada valor é a média de $EC_{50} \pm$ desvio padrão (n=3)

O valor de EC_{50} é um parâmetro amplamente utilizado para determinar a actividade antioxidante de extractos e/ou compostos puros, simulando o modo como a planta ou os compostos puros isolados e purificados a partir de plantas actuam no organismo frente ao radical DPPH. Quanto maior for o valor de EC_{50} , maior será a quantidade necessária de substância para exercer uma acção antioxidante. Desta forma, quanto mais baixo for o valor de EC_{50} maior é o poder antioxidante da planta ou do composto puro (Sousa et al., 2007; Sánchez-Moreno et al., 1998; Brand-Williams et al., 1995).

A quantidade de antioxidante necessário para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50%, EC_{50} (tabela 7), variou de 32,98 \pm 0,10 a 481,37 \pm 3,34 $\mu g/mL$, mostrando o composto catequina (35,44 \pm 0,09 $\mu g/mL$) um valor de EC_{50} comparável com o antioxidante conhecido como quercetina (32,98 \pm 0,10 $\mu g/mL$), enquanto o extracto das folhas de cerejeira e a fracção I apresentaram os maiores valores de EC_{50} (461,11 \pm 4,67 e 481,37 \pm 3,34 $\mu g/mL$, respectivamente).

De todos os extractos estudados de *Prunus avium*, os extractos dos pés de cerejeira com acetona e da madeira de cerejeira com acetona a frio, foram os que apresentaram os menores valores de EC_{50} ($48,91 \pm 0,44$ e $48,31 \pm 0,13$ $\mu\text{g/mL}$), sendo estes valores muito parecidos. Deste modo, foi possível verificar que estes extractos foram os que exibiram maior poder antioxidante, em comparação com os restantes extractos.

Observando os valores obtidos de EC_{50} para os extractos da madeira de cerejeira, verificou-se que a extracção efectuada a frio com AcoEt e acetona ($55,73 \pm 0,15$ e $48,31 \pm 0,13$ $\mu\text{g/mL}$, respectivamente), apesar de obter rendimentos menores que a extracção realizada com extractor de Soxhlet, apresentou menores valores de EC_{50} que a madeira extraída com extractor de Soxhlet ($97,64 \pm 1,38$ $\mu\text{g/mL}$), possuindo por isso estes extractos maior poder antioxidante. Comparando estes extractos por cromatografia em camada fina observou-se que o extracto da madeira extraída com extractor de Soxhlet possuía um maior número de compostos com elevado valor de R_f , que correspondem a flavonóides agliconas de acordo com a literatura (Vinciguerra et al., 2003), podendo-se assim afirmar que estes compostos podem ser responsáveis pela menor actividade antioxidante do extracto.

Comparando também o poder antioxidante das fracções I, II e III isoladas a partir do extracto da madeira de cerejeira, foi possível constatar que a fracção I (que contém os compostos de 1 a 8, entre outros compostos que não foram isolados) apresentou um menor poder antioxidante ($EC_{50}=481,37 \pm 3,34$ $\mu\text{g/mL}$), quando comparada com a fracção II ($EC_{50}=40,55 \pm 0,08$ $\mu\text{g/mL}$) e a fracção III ($EC_{50}=44,09 \pm 0,27$ $\mu\text{g/mL}$) que exibiram um poder antioxidante relativamente alto. O extracto da madeira de cerejeira ($EC_{50}=97,64 \pm 1,38$ $\mu\text{g/mL}$) possui menor actividade antioxidante que as fracções II e III, mas possui maior actividade que a fracção I. Este resultado sugere que os compostos presentes na fracção I, que contém compostos menos polares, podem inibir de certo modo a acção antioxidante do extracto da madeira de cerejeira, tal como já foi mencionado anteriormente.

O composto catequina (9) isolado a partir da fracção II do extracto da madeira de cerejeira mostrou um valor de EC_{50} ($35,44 \pm 0,09$ $\mu\text{g/mL}$) bastante comparável com o valor obtido para o antioxidante conhecido como quercetina ($32,98 \pm 0,10$ $\mu\text{g/mL}$). Este resultado evidencia o forte poder antioxidante da catequina, que está de acordo com o referido na literatura (McNulty et al., 2009; Naczki, Shahidi, 2006; Erlund, 2004; Hollman, Arts, 2000; Wang et al., 1999; Rice-Evans et al., 1997).

A actividade antioxidante dos flavonóides é determinada pela sua estrutura química, em particular pelo número e arranjo dos grupos funcionais em torno do esqueleto base destas moléculas, e de facto, estes dois compostos possuem uma estrutura química que contribui para uma forte actividade antioxidante. Estes compostos possuem o mesmo número de grupos hidroxilo que contribuem para uma forte actividade antioxidante, no entanto, verifica-se que

a única diferença que existe entre estas estruturas é que a quercetina possui uma ligação dupla entre o C2 e C3 em combinação com o grupo carbonilo na posição 4 do anel C, contribuindo esta diferença para um maior poder antioxidante, estando os resultados obtidos de acordo com a literatura (Erlund, 2004; Heim et al., 2002; Rice-Evans et al., 1997; Cook, Samman, 1996)

A percentagem de actividade antioxidante (%AA) é outro parâmetro muito utilizado para determinar em termos percentuais a acção antioxidante de plantas ou compostos isolados a partir destas. Deste modo, os resultados da avaliação quantitativa da actividade antioxidante (%AA) de todos os extractos estudados da espécie *Prunus avium*, do composto catequina e do controlo positivo (quercetina), nas concentrações de 200, 100 e 50 µg/mL, determinados pelo método do radical DPPH, estão apresentados na figura 25.

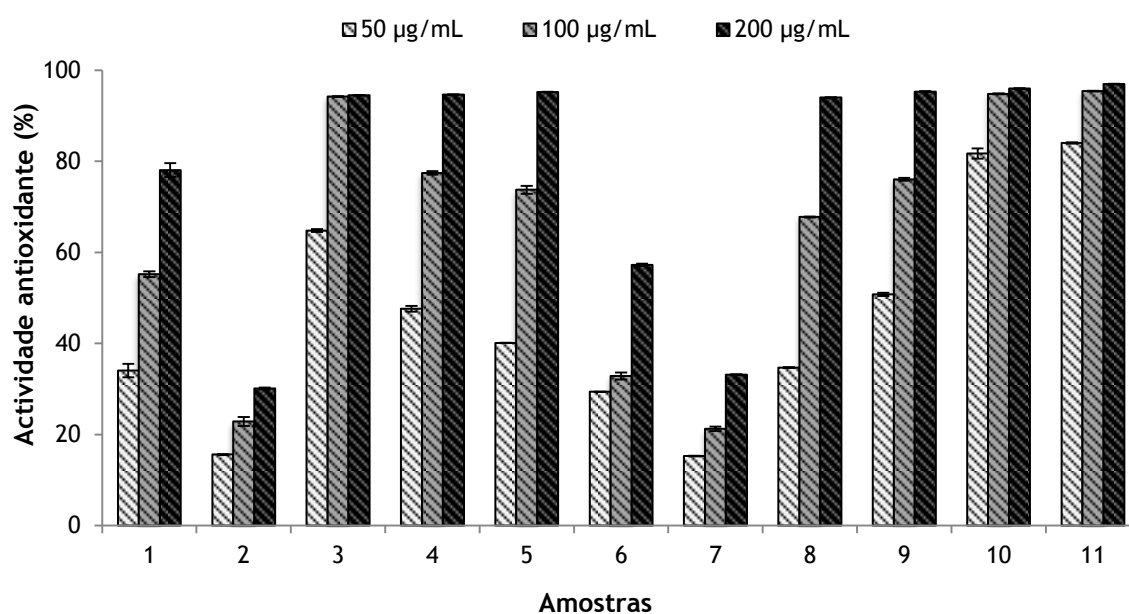


Figura 25 - Percentagem de actividade antioxidante (%AA): 1. Extracto da madeira com acetona; 2. Fracção I; 3. Fracção II; 4. Fracção III; 5. Extracto dos pés com acetona; 6. Extracto da casca com acetona; 7. Extracto das folhas com acetona; 8. Extracto da madeira com AcoEt a frio; 9. Extracto da madeira com acetona a frio; 10. Catequina; 11. Quercetina.

Pela análise do gráfico apresentado na figura 25 e comparando estes valores percentuais de actividade antioxidante (%AA) com os valores de EC_{50} , verificou-se que apesar de se observarem diferenças no potencial antioxidante, todas as amostras exibiram actividade antioxidante, contudo o extracto da casca da madeira, o extracto das folhas e a fracção I, obtida a partir da purificação do extracto da madeira de cerejeira, foram os menos activos nas três concentrações. As restantes amostras, na concentração de 100 µg/mL, apresentaram

actividade antioxidante superior a 60%, atingindo um máximo de $94,21 \pm 0,06\%$ para a fracção II e $94,80 \pm 0,12\%$ para a catequina, enquanto a quercetina (referência) atingiu um máximo de $95,43 \pm 0,06\%$.

Como já foi referido anteriormente a fracção II, obtida a partir da primeira purificação do extracto da madeira de cerejeira, contém o composto catequina, composto este que foi responsável pelo forte potencial antioxidante do extracto da madeira e da fracção II, entre outros compostos que não foram possíveis isolar e purificar. A fracção III, obtida também a partir do extracto da madeira de cerejeira, possui o composto Prunina, entre muitos outros compostos, apresentando de igual modo uma potencial acção antioxidante. Apesar de esta fracção possuir essencialmente flavonóides sob a forma de glicosídeos, que individualmente possuem uma capacidade antioxidante menor que as respectivas agliconas, verificou-se que em conjunto estes compostos contribuem para a maior actividade antioxidante da fracção III quando comparada com a fracção I, que possui essencialmente flavonóides na forma de agliconas.

CAPÍTULO 3

CONCLUSÕES

3. CONCLUSÕES

Na elaboração deste trabalho realizaram-se diversas extracções contínuas sólido-líquido, com solventes distintos, a várias partes da árvore de cerejeira, tal como a madeira, as folhas, os pés de cereja e a casca da madeira, sendo também efectuadas extracções a frio à madeira de cerejeira. Assim, utilizando-se 100g de extracto bruto e considerando os extractos com acetona por conter maior quantidade de compostos fenólicos, constatou-se que foi possível obter 10,59g de extracto da casca da madeira, 8,74g de extracto de pés de cereja, 7,71g de extracto das folhas, 6,85 g de extracto da madeira com 30 anos, 5,09g de extracto da madeira com 10 anos e 1,82 g de extracto da madeira extraída a frio.

Através da análise por cromatografia em camada fina e pela técnica de GC-MS realizada à madeira de cerejeira, foi possível verificar que as várias partes da árvore de *Prunus avium* possuem maioritariamente ácidos gordos e açúcares, sendo os flavonóides um grupo de compostos presentes em muito pouca quantidade. Deste modo, foram realizadas extracções a frio com o intuito de não se obterem este tipo de compostos, constatando-se que estas extracções não foram eficazes.

Verificou-se que o extracto com acetona da madeira proveniente da árvore de cerejeira com mais idade apresentou uma maior quantidade de compostos fenólicos relativamente aos outros extractos, sendo por isso este extracto sujeito a diversas separações e purificações. A identificação estrutural dos compostos puros foi efectuada por espectroscopia de ressonância magnética nuclear de protão (^1H -RMN) e carbono (^{13}C -RMN), técnica bastante utilizada em Química Orgânica.

Neste trabalho através das diversas purificações realizadas por cromatografia em coluna ao extracto da madeira com acetona foi possível obter puros os compostos **1-Pinostrobin**a (0,046g; 0,67%), **2-Tectocrisina** (0,052g; 0,76%), **3-Dihidrowogonina** (0,074g; 1,08%), **4-Pinocembrina** (0,110g; 1,60%), **5-Sakuranetina** (0,081g; 1,18%), **6-Naringenina** (0,164g; 2,40%), **7-Genisteína** (0,075g; 1,10%), **8-Dihidrocanferol** (0,055g; 0,80%), **9-Catequina** (0,259g; 3,78%) e **10-Prunina** (0,136g; 1,99%).

Realizou-se o estudo da avaliação quantitativa da capacidade antioxidante dos extractos da espécie *Prunus avium* e do composto catequina (**9**) isolado a partir do extracto da madeira de cerejeira, segundo o método do radical livre DPPH. Comparando os resultados obtidos para os extractos, observou-se que os extractos dos pés de cereja com acetona e da madeira de cerejeira com acetona a frio foram os que exibiram maior acção antioxidante, enquanto o extracto das folhas de cerejeira apresentou a menor actividade antioxidante. Por outro lado, o composto catequina mostrou uma forte acção antioxidante, comparável com o antioxidante

clássico conhecido como quercetina. Este resultado evidencia o forte poder antioxidante da catequina, que está de acordo com o referido na literatura.

O extracto de acetona da madeira de cerejeira extraída com extractor de Soxhlet apresentou menor actividade antioxidante que os extractos com AcOEt e acetona da madeira a frio. Este resultado pode ser explicado pela presença de um maior número de compostos fenólicos sob a forma de agliconas no extracto da madeira extraída com extractor de Soxhlet, uma vez que estes compostos em conjunto podem ser responsáveis pela inibição do potencial antioxidante.

Este resultado pode ser confirmado quando se compara o poder antioxidante das fracções I, II e III isoladas a partir do extracto da madeira de cerejeira. Assim, verifica-se que a fracção I (que contém os compostos definidos de 1 a 8, entre outros compostos) apresentou menor actividade antioxidante, inibindo assim a acção biológica da madeira de cerejeira. Por outro lado, verifica-se que a fracção II (que contém maioritariamente o composto catequina definido como 9) e a fracção III (que contém o composto Prunina definido como 10) exibem uma forte acção antioxidante. Apesar de esta fracção possuir essencialmente flavonóides sob a forma de glicosídeos, que individualmente possuem uma capacidade antioxidante menor que as respectivas agliconas, verificou-se que em conjunto estes compostos contribuem para a maior actividade antioxidante da fracção III quando comparada com a fracção I, que possui essencialmente flavonóides na forma de agliconas. Para ser confiável esta conclusão deveriam ser isolados todos os compostos presentes em ambos os extractos e, posteriormente devia ser feita uma análise quantitativa da acção antioxidante dos extractos e dos compostos isolados.

A espécie *Prunus avium* é uma planta encontrada em grande quantidade e diversidade no nosso País e possui uma elevada importância económica, sendo uma grande fonte de compostos de origem vegetal que possuem variadas aplicações no ramo da medicina e dos produtos alimentares, tornando-se assim necessário a continuação e o desenvolvimento do estudo dos compostos que podem ser isolados nesta espécie e determinar a sua acção antioxidante.

CAPÍTULO 4

PARTE EXPERIMENTAL

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1. Generalidades

Nas cromatografias em coluna (C.C.) realizadas utilizou-se na fase estacionária a sílica gel 230-400 mesh ASTM e como fase móvel os eluentes AcOEt:Ciclhex, CHCl₃:MeOH e metanol para lavagem das colunas. As cromatografias em camada fina (c.c.f.) foram realizadas em placas de sílica gel da Merck com espessura 0,2mm, 60 F₂₅₄, em suporte de alumínio. Para detectar os compostos utilizou-se luz ultravioleta ($\lambda=254$ nm) e revelador, constituído por 3,0g de vanilina, 100 mL de etanol e 1,5 mL de ácido sulfúrico concentrado, sendo aquecidas as placas de cromatografia a aproximadamente 200°C, durante alguns segundos.

Para concentrar as fracções orgânicas obtidas, em cada cromatografia em coluna, foram utilizados evaporadores rotativos do tipo Büchi-Rotavapor R-114, operando sob pressão reduzida.

Os espectros de infravermelho foram realizados no aparelho Thermo Scientific Nicolet iS10, enquanto os espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) foram efectuados nos espectrómetros: BRUKER AC-P 250, operando a 250 MHz para ¹H e a 62,9 MHz para ¹³C e no espectrómetro BRUKER Avance 300, operando a 300,13 MHz para ¹H e a 75,47 MHz para ¹³C. Os desvios químicos (δ) estão expressos em parte por milhão (ppm) e foram obtidos para cada composto, à temperatura ambiente e em solução de acetona deuterada. As constantes de acoplamento (J) são expressas em Hz e sempre que necessário a sua determinação foi efectuada por experiências de desacoplamento. A distinção do tipo de carbonos foi determinada pela técnica DEPT.

Na avaliação quantitativa da actividade antioxidante a leitura das absorvências foram realizadas num espectrofotómetro UV-Vis Thermo Scientific Helios Omega, no comprimento de onda 515 nm.

4.2. Preparação do material vegetal

Utilizou-se como material vegetal a madeira, a casca da madeira, os pés de cereja e as folhas da árvore de cerejeira. As madeiras utilizadas foram provenientes de duas árvores de cerejeira com diferentes idades (10 e 30 anos). O local de colheita deste material vegetal foi no Fundão, em Setembro de 2010.

Após colheita, o material vegetal (madeira, casca da madeira e pés de cereja) foi seco à temperatura ambiente e de seguida na estufa a 40°C. As folhas da árvore de cerejeira foram somente secas à temperatura ambiente. Posteriormente, este material foi moído num moinho produzindo partículas de malha 20 mesh, ficando assim disponível para extracção.

4.3. Técnicas experimentais e caracterização dos compostos

4.3.1. Extracção do material vegetal

O material vegetal foi extraído segundo uma metodologia simples e amplamente utilizada por diversos investigadores que desejam extrair um óleo fixo de uma fonte natural sólida. Foi utilizado o método de extracção contínua utilizando o extractor Soxhlet, utilizando solventes orgânicos de baixo ponto de ebulição. O material vegetal foi colocado num cartucho poroso na câmara do extractor. O solvente, colocado no balão, foi aquecido e os vapores condensam-se na câmara do extractor e que caíram sobre o material a extrair. Quando o nível de destilado na câmara de extracção atingiu o nível do sifão, a solução retornou ao balão. Esta metodologia tornou a operação automática e simples.

As condições experimentais utilizadas em ambos os extractos foram idênticas, ou seja, a extracção foi realizada utilizando 100g de material vegetal com o solvente n-hexano durante 24h e de seguida foi realizada a extracção com acetona, também durante um período de 24h. A temperatura utilizada foi a temperatura de refluxo do solvente e a pressão atmosférica. Por fim, os extractos obtidos foram concentrados e analisados por cromatografia em camada fina. Foram também realizadas duas extracções da madeira de cerejeira a frio, utilizando como solventes acetato de etilo e acetona. Em ambos os casos, utilizou-se 100g de material vegetal e deixou-se a mistura sob agitação durante 24h, à temperatura ambiente. De igual modo, os extractos obtidos foram concentrados e analisados por cromatografia em camada fina.

4.3.2. Método de isolamento e purificação

A separação dos compostos existentes no extracto da madeira de cerejeira com acetona foi realizada através de várias cromatografias em coluna (C.C.). Este método de isolamento e purificação de compostos consiste na partição entre duas fases, sólida e líquida, baseada na capacidade de adsorção e solubilidade. O sólido-adsorvente deve ser um material insolúvel na fase líquida associada, sendo que os mais utilizados são a sílica gel (SiO_2).

4.3.3. Caracterização estrutural dos compostos

1-Pinostrobin (5-hidroxi-7-metoxiflavanona)

^1H -RMN ($\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$) (δ , ppm): 2,80 (1H, dd, $J_{3b,2}=3,0$ Hz, $J_{3b,3a}=17,0$ Hz, H-3b), 3,20 (1H, dd, $J_{3a,2}=12,8$ Hz, $J_{3a,3b}=17,0$ Hz, H-3a), 3,85 (3H, s, OCH_3 -7), 5,60 (1H, dd, $J_{2,3a}=12,8$ Hz, $J_{2,3b}=3,0$ Hz, H-2), 6,06 (1H, d, $J_{8,6}=2,0$ Hz, H-8), 6,09 (1H, d, $J_{6,8}=2,0$ Hz, H-6), 7,59-7,39 (5H, m, Ar-B), 12,13 (1H, s, OH-5).

^{13}C -RMN ($\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$) (δ , ppm): 43,50 (C-3), 56,27 (OCH_3 -7), 80,06 (C-2), 94,59 (C-8), 95,49 (C-6), 103,76 (C-10), 127,28-129,09 (C-2', C-3', C-4', C-5', C-6'), 130,66 (C-1'), 164,21 (C-9), 165,02 (C-7), 168,87 (C-5), 197,68 (C-4).

2-Tectocrisina (5-hidroxi-7-metoxiflavona)

^1H -RMN ($\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$) (δ , ppm): 3,94 (3H, s, OCH_3 -7), 6,35 (1H, d, $J_{8,6}=2,13$ Hz, H-8), 6,74 (1H, d, $J_{6,8}=2,15$ Hz, H-6), 6,84 (1H, s, H-3), 7,60-7,63 (3H, m, Ar-B, H-3', H-4', H-5'), 8,07-8,11 (2H, m, Ar-B, H-2', H-6'), 11,88 (1H, s, OH-5).

^{13}C -RMN ($\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$) (δ , ppm): 56,54 (OCH_3 -7), 93,43 (C-8), 98,96 (C-6), 118,93 (C-10), 106,33 (C-3), 127,35 (C-2', C-6'), 130,07 (C-3', C-5'), 132,22 (C-1'), 132,90 (C-4'), 158,88 (C-2), 163,11 (C-9), 164,95 (C-5), 166,87 (C-7), 183,35 (C-4).

3-Dihidrowogonina (5,7-dihidroxi-8-metoxiflavanona)

^1H -RMN ($\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$) (δ , ppm): 2,85 (1H, dd, $J_{3b,2}=3,0$ Hz, $J_{3b,3a}=17,0$ Hz, H-3b), 3,15 (1H, dd, $J_{3a,2}=12,8$ Hz, $J_{3a,3b}=17,0$ Hz, H-3a), 3,74 (3H, s, OCH_3 -8), 5,64 (1H, dd, $J_{2,3b}=3,0$ Hz, $J_{2,3a}=12,8$ Hz, H-2), 6,01 (1H, s, H-6), 7,41-7,62 (5H, m, Ar-B), 9,25 (1H, s, OH-7), 11,96 (1H, s, OH-5).

^{13}C -RMN ($\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$) (δ , ppm): 43,62 (C-3), 61,37 (OCH_3 -8), 80,31 (C-2), 96,72 (C-6), 103,32 (C-10), 127,25-129,59 (C-2', C-3', C-4', C-5', C-6'), 140,09 (C-1'), 155,07 (C-8), 160,39 (C-9), 160,51 (C-5), 197,06 (C-4).

4-Pinocembrina (5,7-dihidroxi-flavanona)

¹H-RMN (C₃D₆O) (δ, ppm): 2,81 (1H, dd, $J_{3b,2}=3,0$ Hz, $J_{3b,3a}=17,2$ Hz, H-3b), 3,15 (1H, dd, $J_{3a,2}=12,8$ Hz, $J_{3a,3b}=17,2$ Hz, H-3a), 5,57 (1H, dd, $J_{2,3b}=3,0$ Hz, $J_{2,3a}=12,8$ Hz, H-2), 5,97 (1H, d, $J_{8,6}=2,0$ Hz, H-8), 6,0 (1H, d, $J_{6,8}=2,0$ Hz, H-6), 7,39-7,58 (5H, m, Ar-B), 9,83 (1H, s, OH-7), 12,17 /1H, s, OH-5).

¹³C-RMN (C₃D₆O) (δ, ppm): 43,62 (C-3), 79,98 (C-2), 95,94 (C-8), 96,98 (C-6), 103,22 (C-10), 127,36-129,53 (C-2', C-3', C-4', C-5', C-6'), 140,07 (C-1'), 164,18 (C-9), 165,32 (C-7), 167,51 (C-5), 196,90 (C-4).

5-Sakuranetina (4',5-dihidroxi-7-metoxiflavanona)

¹H-RMN (C₃D₆O) (δ, ppm): 2,75 (1H, dd, $J_{3b,2}=3,0$ Hz, $J_{3b,3a}=17,05$ Hz, H-3b), 3,20 (1H, dd, $J_{3a,2}=12,4$ Hz, $J_{3a,3b}=17,05$ Hz, H-3a), 3,84 (3H, s, OCH₃-7), 5,47 (1H, dd, $J_{2,3b}=3,0$ Hz, $J_{2,3a}=12,4$ Hz, H-2), 6,03 (1H, s, H-8), 6,03 (1H, s, H-6), 6,90 (2H, d, $J=8,10$ Hz, H-3', H-5'), 7,39 (2H, d, $J=8,10$ Hz, H-2', H-6'), 8,63 (1H, s, OH-4'), 12,14 (1H, s, OH-5).

¹³C-RMN (C₃D₆O) (δ, ppm): 43,49 (C-3), 56,25 (OCH₃-7), 80,05 (C-2), 94,60 (C-8), 95,49 (C-6), 103,74 (C-10), 116,22 (C-3', C-5'), 129,08 (C-2', C-6'), 130,63 (C-1'), 158,78 (C-4'), 164,20 (C-9), 165,00 (C-7), 168,85 (C-5), 197,66 (C-4).

6-Naringenina (4',5,7-trihidroxi-flavanona)

¹H-RMN (C₃D₆O) (δ, ppm): 2,75 (1H, dd, $J_{3b,2}=3,0$ Hz, $J_{3b,3a}=17,0$ Hz, H-3b), 3,20 (1H, dd, $J_{3a,2}=12,8$ Hz, $J_{3a,3b}=17,0$ Hz, H-3a), 5,57 (1H, dd, $J_{2,3b}=3,0$ Hz, $J_{2,3a}=12,8$ Hz, H-2), 6,30 (1H, d, $J_{8,6}=2,12$ Hz, H-8), 6,43 (1H, d, $J_{6,8}=2,12$ Hz, H-6), 6,91 (2H, d, $J=8,50$ Hz, H-3', H-5'), 7,40 (2H, d, $J=8,50$ Hz, H-2', H-6'), 8,56 (1H, s, OH-4'), 9,69 (1H, s, OH-7), 12,19 (1H, s, OH-5).

¹³C-RMN (C₃D₆O) (δ, ppm): 43,56 (C-3), 80,02 (C-2), 95,96 (C-8), 96,93 (C-6), 103,29 (C-10), 116,29 (C-3', C-5'), 129,13 (C-2', C-6'), 130,85 (C-1'), 158,79 (C-4'), 164,47 (C-9), 165,37 (C-5), 167,48 (C-7), 197,35 (C-4).

7-Genisteína (4',5,7-trihidroxi-isoflavona)

¹H-RMN (C₃D₆O) (δ, ppm): 6,28 (1H, d, $J_{8,6}=2,13$ Hz, H-8), 6,41 (1H, d, $J_{6,8}=2,13$ Hz, H-6), 6,90 (2H, d, $J=8,53$ Hz, H-3', H-5'), 7,45 (2H, d, $J=8,53$ Hz, H-2', H-6'), 8,16 (1H, s, H-2), 8,58 (1H, s, OH-4'), 9,76 (1H, s, OH-7), 12,19 (1H, s, OH-5).

¹³C-RMN (C₃D₆O) (δ, ppm): 94,54 (C-8), 99,90 (C-6), 106,20 (C-10), 116,04 (C-3', C-5'), 123,09 (C-1'), 124,08 (C-3), 131,24 (C-2', C-6'), 154,38 (C-2), 158,53 (C-9), 159,11 (C-4'), 163,97 (C-5), 165,10 (C-7), 181,72 (C-4).

8-Dihidrocanferol (3,4',5,7-tetrahidroxi-flavanona)

$^1\text{H-RMN}$ ($\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$) (δ , ppm): 3,24 (1H, s, OH-3), 4,69 (1H, d, $J_{3,2}=11,53$ Hz, H-3), 5,08 (1H, d, $J_{2,3}=11,53$ Hz, H-2), 5,94 (1H, d, $J_{8,6}=2,0$ Hz, H-8), 5,99 (1H, d, $J_{6,8}=2,0$ Hz, H-6), 6,88 (2H, d, $J=8,53$ Hz, H-3', H-5'), 7,42 (2H, d, $J=8,53$ Hz, H-2', H-6'), 8,98 (1H, s, OH-4'), 11,72 (1H, s, OH-7), 12,18 (1H, s, OH-5).

$^{13}\text{C-RMN}$ ($\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$) (δ , ppm): 73,14 (C-3), 84,38 (C-2), 96,08 (C-8), 97,13 (C-6), 101,53 (C-10), 116,04 (C-3', C-5'), 129,13 (C-1'), 130,35 (C-2', C-6'), 158,89 (C-4'), 164,21 (C-9), 165,02 (C-5), 167,93 (C-7), 197,29 (C-4).

9-Catequina (3',4'-dihidroxifenil-croman-3,5,7-triol)

$^1\text{H-RMN}$ ($\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$) (δ , ppm): 2,56 (1H, dd, $J_{4b}=8,51$ Hz, $J_{4b,4a}=16,10$ Hz, H-4b), 2,94 (1H, dd, $J_{4a}=5,54$ Hz, $J_{4a,4b}=16,10$ Hz, H-4a), 4,02 (1H, m, H-3), 4,59 (1H, d, $J=7,83$ Hz, H-2), 5,90 (1H, d, $J_{8,6}=2,10$ Hz, H-8), 6,05 (1H, d, $J_{6,8}=2,10$ Hz, H-6), 6,77 (1H, dd, $J_{6',2'}=2,0$ Hz, $J_{6',5'}=8,10$ Hz, H-6'), 6,82 (1H, d, $J_{5',6'}=8,10$ Hz, H-5'), 6,92 (1H, d, $J_{2',6'}=2,0$ Hz, H-2').

$^{13}\text{C-RMN}$ ($\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$) (δ , ppm): 28,67 (C-4), 68,20 (C-3), 82,55 (C-2), 95,29 (C-8), 95,99 (C-6), 100,49 (C-10), 115,11 (C-2'), 115,60 (C-5'), 119,97 (C-6'), 132,01 (C-1'), 145,49 (C-4'), 145,55 (C-3'), 156,74 (C-9), 157,07 (C-5), 157,57 (C-7).

10-Prunina (4',5-dihidroxi-flavanona-7-D-glucose)

$^1\text{H-RMN}$ ($\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$) (δ , ppm): 2,76 (1H, dd, $J_{3b,2}=3,0$ Hz, $J_{3b,3a}=17,0$ Hz, H-3b), 3,24 (1H, dd, $J_{3a,2}=12,8$ Hz, $J_{3a,3b}=17,0$ Hz, H-3a), 3,88-3,45 (4H, m, H-2'', H-3'', H-4'', H-5''), 4,40 (1H, m, H-6a''), 4,75 (1H, d, $J=3,42$ Hz, H-6b''), 5,07 (1H, d, $J=7,68$ Hz, H-1''), 6,13 (1H, d, $J_{8,6}=2,13$ Hz, H-8), 6,16 (1H, d, $J_{6,8}=2,13$ Hz, H-6), 6,90 (1H, d, $J=8,50$ Hz, H-3', H-5'), 7,40 (1H, d, $J=8,50$ Hz, H-2', H-6'), 8,65 (1H, s, OH-4'), 12,09 (1H, s, OH-5).

$^{13}\text{C-RMN}$ ($\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$) (δ , ppm): 43,54 (C-3), 62,45 (C-6''), 71,03 (C-4''), 74,46 (C-2''), 77,72 (C-5''), 77,87 (C-3''), 80,12 (C-2), 96,50 (C-8), 97,62 (C-6), 100,90 (C-1''), 104,49 (C-10), 116,26 (C-3', C-5'), 129,16 (C-2', C-6'), 130,51 (C-1'), 158,88 (C-4'), 164,10 (C-9), 164,73 (C-5), 166,71 (C-7), 198,05 (C-4).

4.3.4. Análise quantitativa da actividade antioxidante

O potencial antioxidante dos extractos e do composto catechin, isolado a partir da madeira de cerejeira com acetona, foi determinado pelo método do radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazilo), seguindo a metodologia descrita na literatura, na qual se controla o consumo do radical livre DPPH pelas amostras, resultando numa diminuição da absorvência de soluções de diferentes concentrações (Tabart et al., 2009; Moreira et al., 2008; Sousa et al., 2007; Kroyer, Hegedus, 2001; Sánchez-Moreno et al. 1998; Brand-Williams et al. 1995). A diminuição da absorvência foi determinada a 515 nm, usando como referência o conhecido antioxidante quercetina.

Construção da curva de calibração do DPPH

Para calcular a exacta concentração inicial do radical DPPH foi necessário construir uma curva de calibração. Nesta primeira etapa, foram preparados 50 mL de solução de DPPH em metanol com uma concentração superior a 40 µg/mL, que é mantida sob refrigeração e protegida da luz. De seguida, foram realizadas diluições de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 e 40 µg/mL, na qual a curva de calibração foi construída a partir dos valores da absorvência a 515 nm de todas as soluções (5 a 40 µg/mL), medidas em células de vidro com 1cm de percurso óptico e tendo como “branco” o metanol. As medições foram efectuadas em triplicado e em intervalos de 1 minuto entre cada leitura. A equação da curva de calibração do DPPH foi $A_{515nm} = 0,0238[DPPH]_t - 0,0029$, onde $[DPPH]_t$ corresponde à concentração de DPPH no meio e é expressa em µg/mL, A é a absorvência medida no comprimento de onda de 515 nm e $R^2=0,9963$ é o coeficiente de determinação.

Leitura da absorvência das amostras

As soluções dos extractos, do composto catechin e do controlo positivo quercetina em metanol foram preparadas em diferentes gamas de concentrações (2000 a 6,25 µg/mL), dependendo este intervalo de concentrações do tipo de extracto ou composto que se quer analisar. As absorvências das misturas reaccionais (0,3 mL de amostra e 2,7 mL da solução de DPPH com concentração de 40 µg/mL) foram lidas em intervalos de 1 minuto até completar 1 hora (no máximo), no comprimento de onda de 515 nm. Utilizou-se como branco 2,7 mL de metanol e 0,3 mL de amostra. A percentagem de DPPH remanescente (%DPPH_{REM}) foi calculada a partir da equação 1:

$$\%DPPH_{REM} = \frac{[DPPH]_t}{[DPPH]_{t=0}} \times 100 \quad (1)$$

Para cada concentração testada e através da equação da curva de calibração do radical DPPH, foi possível calcular o valor percentual de DPPH remanescente, onde $[DPPH]_t$ corresponde à

concentração de DPPH no meio num determinado instante, após a reacção com o extracto e $[DPPH]_{t=0}$ corresponde a 40 µg/mL, ou seja, a concentração inicial do radical DPPH.

A equação da curva exponencial obtida através da representação gráfica dos valores percentuais de DPPH remanescente em função da concentração da solução do extracto, do composto catechin ou da referência quercetina, permite calcular a concentração de amostra necessária para diminuir a concentração inicial de DPPH remanescente para metade (EC_{50}).

Os valores de absorvência em todas as concentrações testadas, num determinado instante, foram convertidos em percentagem de actividade antioxidante (%AA) através da equação (2):

$$\%AA = \frac{[Abs_{controlo} - (Abs_{amostra} - Abs_{branco})]}{Abs_{controlo}} \times 100 \quad (2)$$

$Abs_{controlo}$ é a absorvência inicial da solução metanólica de DPPH e $Abs_{amostra}$ é a absorvência da mistura reaccional (DPPH + amostra) (Tabart et al., 2009; Moreira et al., 2008; Sousa et al., 2007; Kroyer, Hegedus, 2001).

BIBLIOGRAFIA

Bakkali, F.; Averbeck, S.; Averbeck, D.; Idaomar, M.; Biological effects of essential oils - A review. *Food and Chemical Toxicology*, **2008**, 46:446-475.

Balasundram, N.; Sundram, K.; Samman, S.; Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence and potential uses. *Food Chemistry*, **2006**, 99:191-203.

Balunas, M.J.; Kinghorn, A.D; Drug discovery from medicinal plants. *Life Sciences*, **2005**, 78:431-441.

Brand-Williams, W.; Cuvelier, M.E.; Berset, C.; Use a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm-wissenschaft und Techonology*, **1995**, 28:25-30.

Céliz, G.; Daz, M.; Biocatalytic preparation of alkyl esters of citrus flavanone glucoside prunin in organic media. *Process Biochemistry*, **2011**, 46:94-100.

Chirinos, R.; Rogez, H.; Campos, D.; Pedreschi, R.; Larondelle, Y.; Optimization of extraction conditions of antioxidant phenolic compounds from mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pavón) tubers. *Separation and Purification Techonology*, **2007**, 55:217-225.

Cook N.C.; Samman, S.; Flavonoids - Chemistry, metabolism, cardioprotective effects and dietary sources. *Nutritional Biochemistry*, **1996**, 7:66-76.

Djeridane, A.; Yousfi, M.; Nadjemi, B.; Boutassouna, D.; Stocker, P.; Vidal, N.; Antioxidant activity of some algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chemistry*, **2006**, 97:654-660.

Erlund, I.; Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology. *Nutrition Research*, **2004**, 24:851-874.

Faniadis, D.; Drougoudi, P.D.; Vasilakakis, M.; Effects of cultivar, orchard elevation, and storage on fruit quality characters of sweet cherry (*Prunus avium* L.). *Scientia Horticulturae*, **2010**, 125:301-304.

Gao, Z.; Huang, K.; Yang, X.; Xu, H.; Free radical scavenging and antioxidant activities of flavonoids extracted from the radix of *Scutellaria baicalensis* Georgi. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1999**, 1472:643-650.

Geibel, M.; Geiger, H.; Treutter D.; Tectochrysin-5-glucoside and Genistein-5-glucoside from the bark of *Prunus cerasus*, *Phytochemistry*, **2001**, 29:1351-1353.

Gonçalves, B.; Ecofisiologia da cerejeira (*Prunus avium* L.), composição fenólica e actividade antioxidante dos frutos. Tese de Doutoramento em Engenharia Biológica, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real, **2006**.

González-Gomez, D.; Lozano, M.; Fernández-León, M.; Bernalte, M.; Ayuso, M.C.; Rodríguez, A.B.; Sweet cherry phytochemicals: Identification and characterization by HPLC-DAD/ESI-MS in six sweet-cherry cultivars grown in Valle del Jerte (Spain). *Journal of Food Composition and Analysis*, **2010**, 23:533-539.

Heim, K.E.; Tagliaferro, A.R.; Bobilya, D.J.; Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry*, **2002**, 13:572-584.

Hollman, P. C. H.; Arts, L. C. W.; Flavonols, flavones and flavanols - nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **2000**, 60:1081-1093.

Kirakosyan, A.; Seymour, E.M.; Noon, K.R.; Llanes, D.E.U.; Kaufman, P.B.; Bolling, S.F.; Interations of antioxidants isolated from tart cherry (*Prunus cerasus*) fruits. *Food Chemistry*, **2010**, 122:78-83.

Kong, I.M.; Chia, L.S.; Goh, N.K.; Chia, T.F.; Brouillard, R.; Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry*, **2003**, 64:923-933.

Kroyer, G.; Hegedus, N.; Evaluation of bioactive properties of pollen extracts as functional dietary food supplement. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, **2001**, 2:171-174.

Lobo, A. M.; Lourenço, A. M.; Biossíntese de produtos naturais. *Ensino da ciência e da tecnologia*, Lisboa, **2007**.

Lopes, P.; Extracção, isolamento e caracterização de compostos da espécie *Prunus avium* com potencial antioxidante. Projecto de Licenciatura em Química Industrial, Universidade da Beira Interior, **2006**.

Maisuthisakul, P.; Gordon, M.; Antioxidant and tyrosinase inhibitory activity of mango seed kernel by product. *Food chemistry*, **2009**, 117:332-341.

Meyer, A. S.; Heinonen, M.; Frankel, E. N.; Antioxidant interactions of Catechin, cyaniding, caffeic acid, quercetin and ellagic acid on human LDL oxidation. *Food Chemistry*, **1998**, 61:71-75.

- McNulty, J.; Nair, J.J.; Bollareddy, E.; Keskar, K.; Thorat, A.; Crankshaw, D.J.; Holloway, A.C.; Khan, G.; Wright, G.D.; Ejim, L.; Isolation of flavonoids from the heartwood and resin of *Prunus avium* and some preliminary biological investigations. *Phytochemistry*, **2009**, 70:2040-2046.
- Modak, B.; Rojas, M.; Torres, R.; Rodilha, J.; Luebert, F.; Antioxidant activity of a new aromatic Geranyl Derivative of the resinous exudates from *Heliotropium glutinosum*. *Molecules*, **2007**, 12.
- Moreira, L.; Dias, L. G.; Pereira, J. A.; Estevinho, L.; Antioxidant properties, total phenols and pollen analysis of propolis samples from Portugal. *Food and Chemical Toxicology*, **2008**, 46:3482-3485.
- Naczek, M.; Shahidi, F.; Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **2006**, 41:1523-1542.
- Rates, S.M.K.; Plants as source of drugs. *Toxicon*, **2001**, 39:603-613.
- Rice-Evans, A. C.; Miller, N., J.; Paganga, G.; Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science*, **1997**, 2:152-159.
- Ryan, D.; Antolovich, M.; Prenzler, P.; Robards, K.; Lavee, S.; Biotransformations of phenolic compounds in *Olea europaea* L. *Scientia Horticulturae*, **2002**, 92: 147-176.
- Sánchez-Moreno, C.; Larrauri, J. A.; Saura-Calixto, F.; A Procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **1998**, 76:270-276.
- Scherer, R.; Godoy, H.T.; Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. *Food Chemistry*, **2009**, 112:654-658.
- Serra, A.T.; Seabra, I.J.; Braga, M.E.M.; Bronze, M.R.; Sousa, H.C.; Duarte, C.M.M.; Processing cherries (*Prunus avium*) using supercritical fluid technology. Part 1: Recovery of extract fractions rich in bioactive compounds. *J. of Supercritical Fluids*, **2010**, 55:184-191.
- Sokół-Lętowska, A. S.; Oszmiański, J.; Wojdyło, A.; Antioxidant activity of the phenolic compounds of hawthorn pine and skullcap. *Food Chemistry*, **2006**, 103: 853-859.
- Sousa, C M.; Silva, H. R.; Vieira-Jr, G. M.; Ayres, M.; Costa, C.; Araújo, D.; Cavalcante, L.; Barros, E.; Araújo, P.; Brandão, M.; Chaves, M.; Fenóis totais e actividade antioxidante de cinco plantas medicinais, *Química Nova*, **2007**, 30:351-355.

Stone, W.L.; Leclair, I.; Ponder, T.; Bagss, G.; Barret-Reis, B.; Infants discriminate between natural and synthetic vitamin E. *American Journal of Clinical Nutrition*, **2003**, 77:899-906.

Tabart, J.; Kevers, C.; Pincemail, J.; Defraigne, J.O.; Dommès, J.; Comparative antioxidant capacities of phenolic compounds measured by various tests. *Food Chemistry*, **2009**, 113:1226-1233.

Taiz, L.; Zeiger, E.; Fisiologia vegetal, 3ªEdição, *Porto Alegre: Artmed*, **2004**.

Valentão, P.L.; Hipericão-Do-Gerês, Cardo-Do-Coalho, Fel-Da-Terra - Metodologias de Controlo de Qualidade com base na fracção fenólica. Estudos de acção antioxidante e hepatoprotectora. Tese de Doutoramento, Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, **2003**.

Vinciguerra, V.; Luna, M.; Bistoni, A.; Zollo, F.; Variation in the Composition of the Heartwood Flavonoids of *Prunus avium* by On-column Capillary Gas Chromatography. *Phytochemical*, **2003**, 14:371-377.

Wang, H.; Nair, M.G.; Strasburg, G.M.; Booren, A.M.; Gray, J.I.; Antioxidant Polyphenols from Tart Cherries (*Prunus cerasus*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **1999**, 47:840-844.

Willför, S. M.; Ahotupa, M. O.; Hemming, J. E.; Reunanen, M. H. T.; Eklund, P. C.; Sjöholm, R. E.; Eckerman, C. S. E.; Pohjamo, S. P.; Holmbom, B. R.; Antioxidant activity of knotwood extractives and phenolic compounds of selected tree species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2003**, 51:7600-7606.

Willits, M.G.; Giovanni, M.; Prata, R.T.N.; Kramer, C.M.; Luca, V.; Steffens, J.C.; Graser, G.; Bio-fermentation of modified flavonoids: an example of in vivo diversification of secondary metabolites. *Phytochemistry*, **2004**, 65:31-41.

Wood, J. E.; Senthilmohan, S. T.; Peskin, A. V.; Antioxidant activity of procyanidin-containing plant extracts at different pHs. *Food Chemistry*, **2002**, 77:155-161.

Yokozawa, T.; Oura, H.; Antihyperlipidemic effects of flavonoids from *Prunus davidiana*. *Journal of Natural Products*, **1991**, 54:218-224.

ANEXO I

ESPECTROS DE ^1H -RMN E ^{13}C -RMN

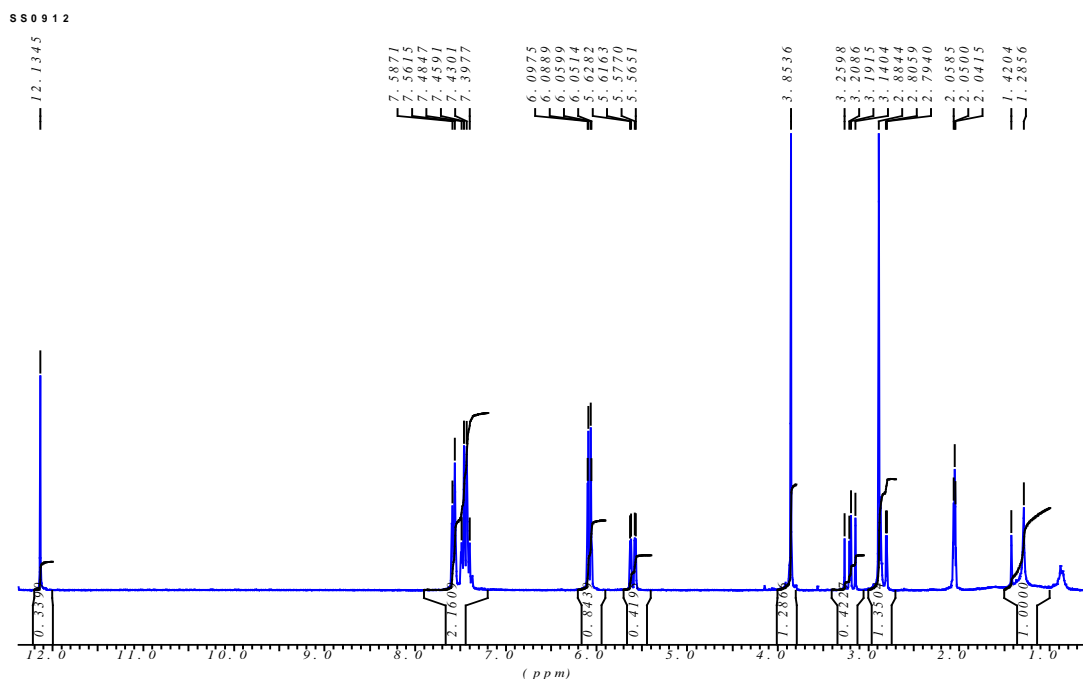


Figura 26 - Espectro de ^1H -RMN da Pinostrobin (1).

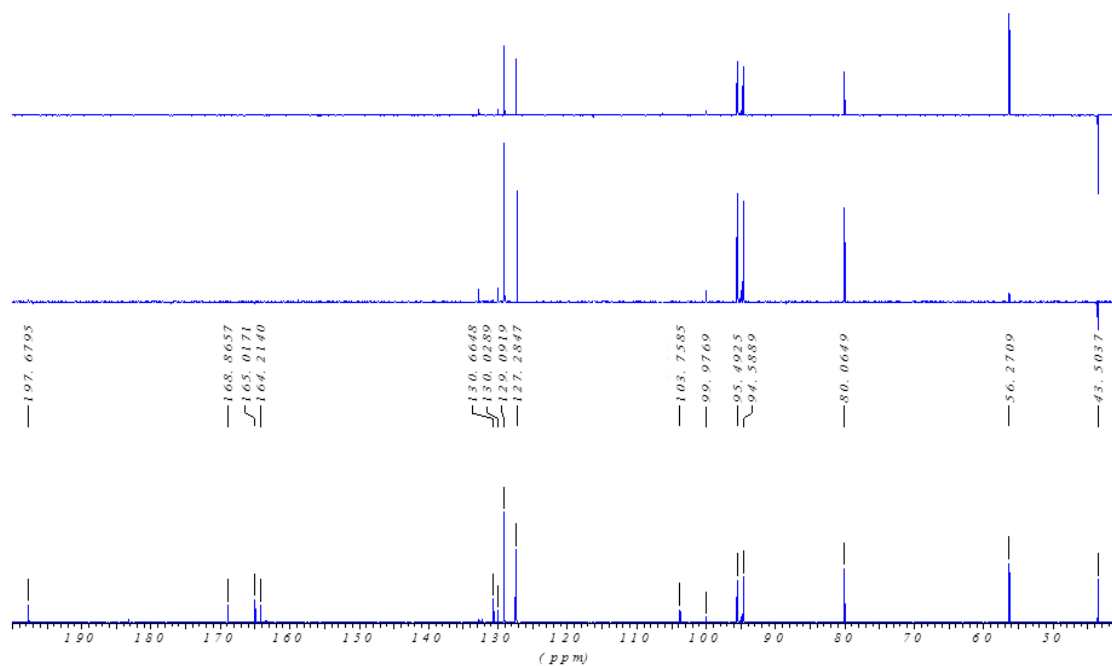


Figura 27 - Espectro de ^{13}C -RMN da Pinostrobin (1).



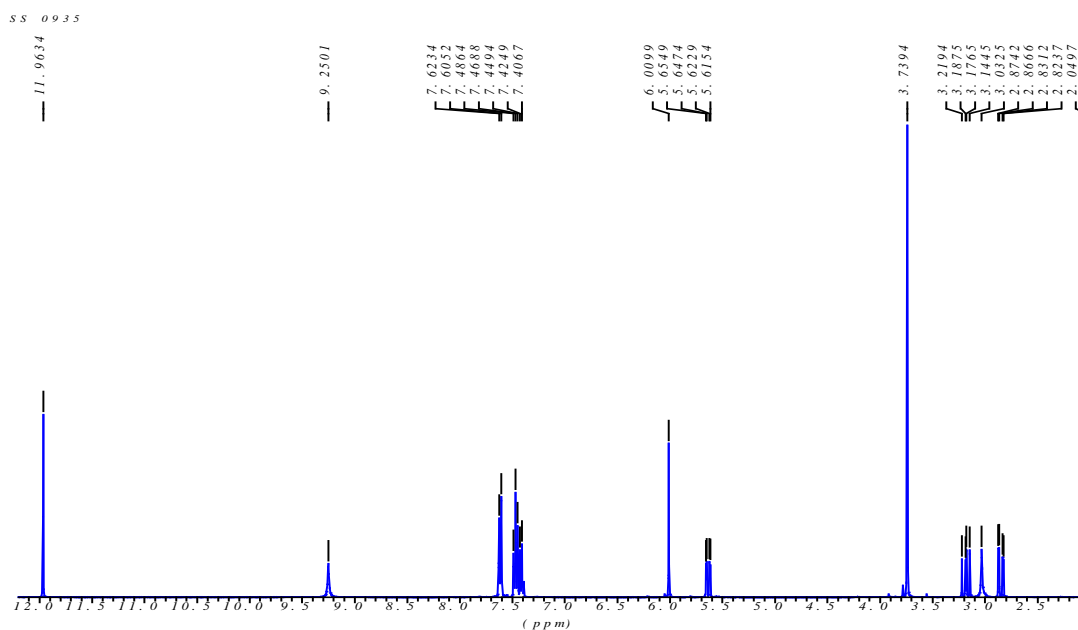


Figura 30 - Espectro de ^1H -RMN da Dihydrowogonina (3).

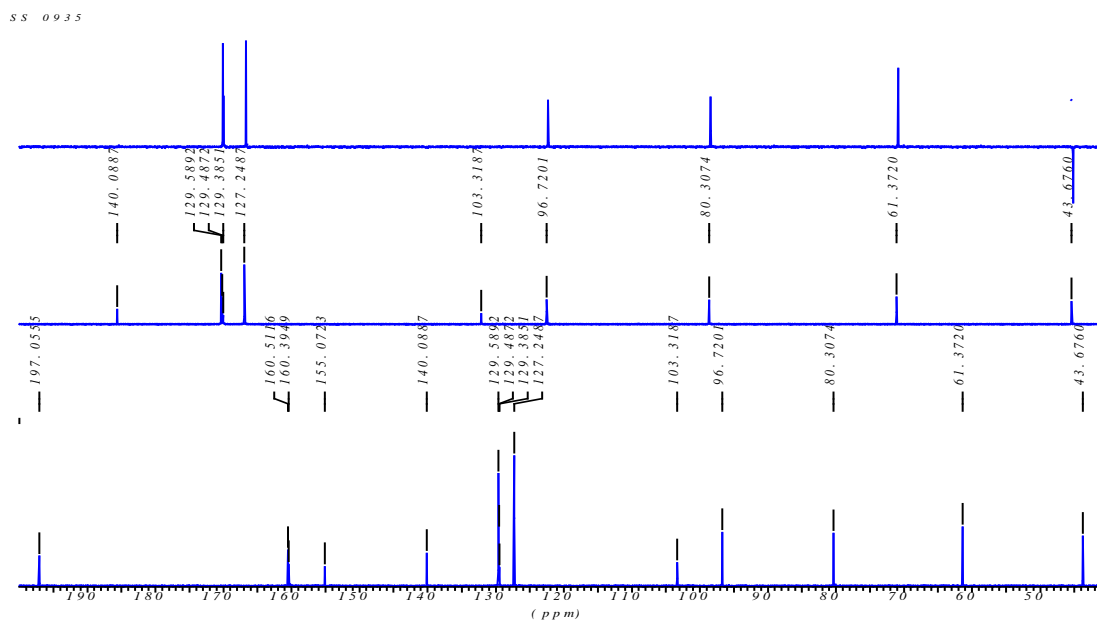


Figura 31 - Espectro de ^{13}C -RMN da Dihydrowogonina (3).

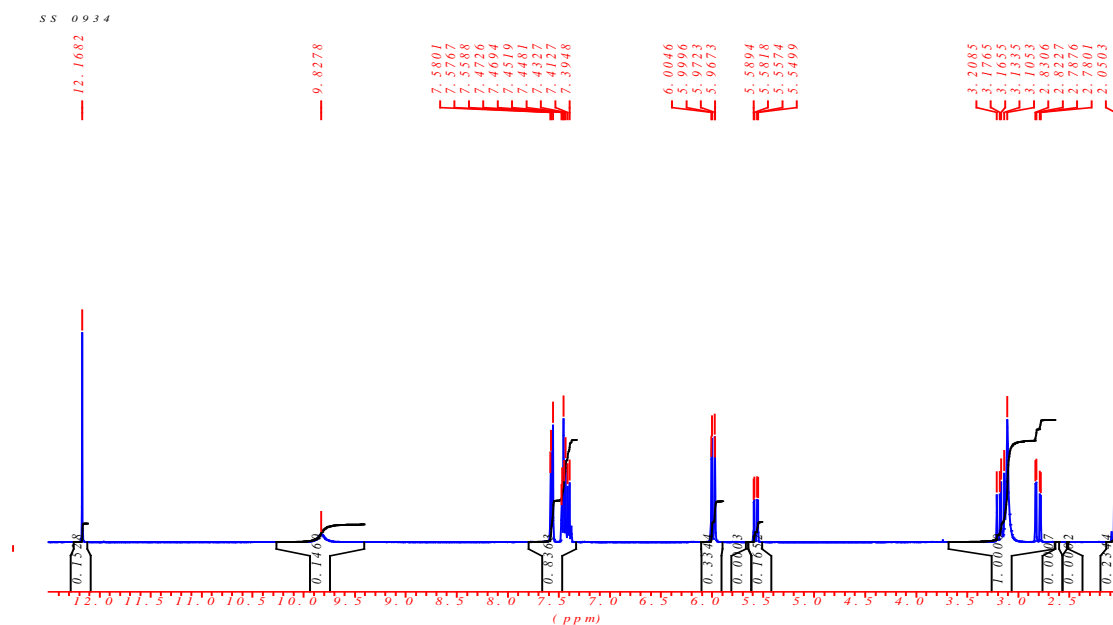


Figura 32 - Espectro de ^1H -RMN da Pinocembrina (4).

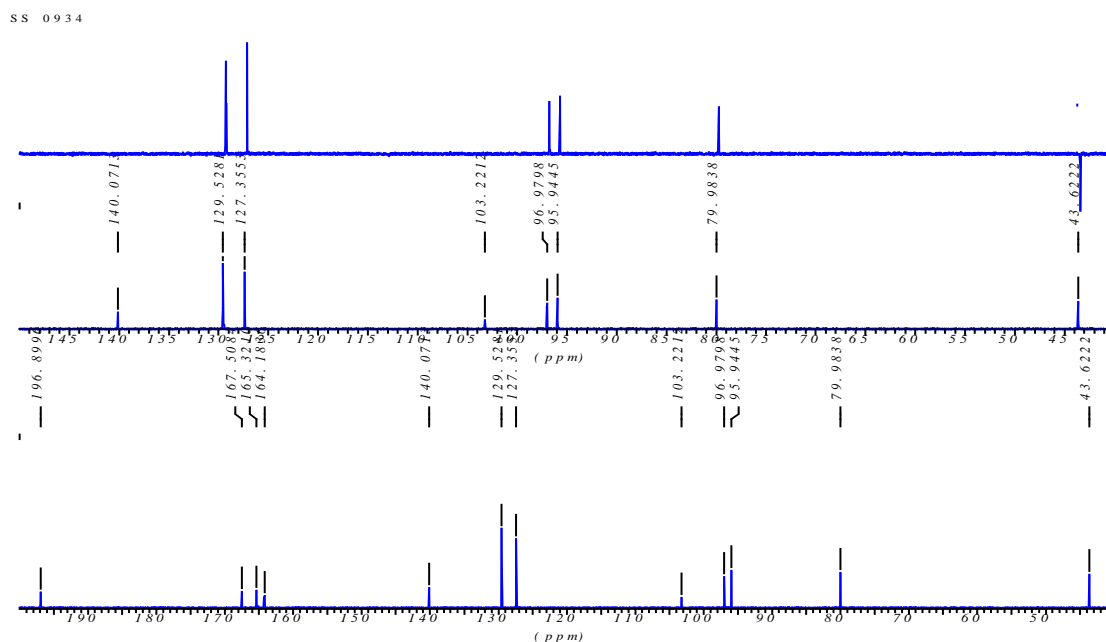
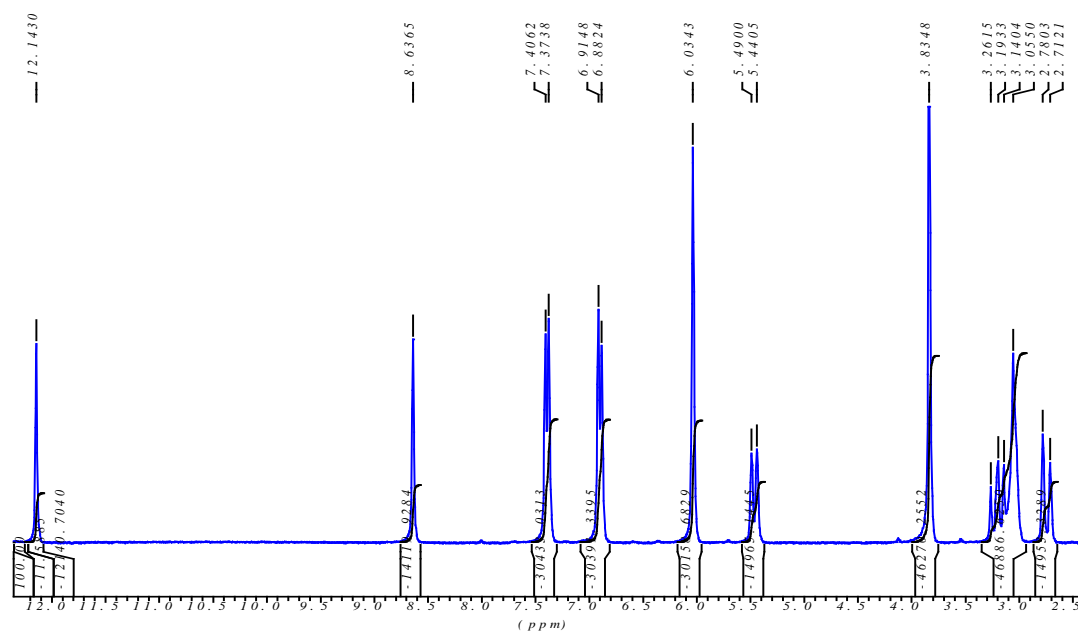
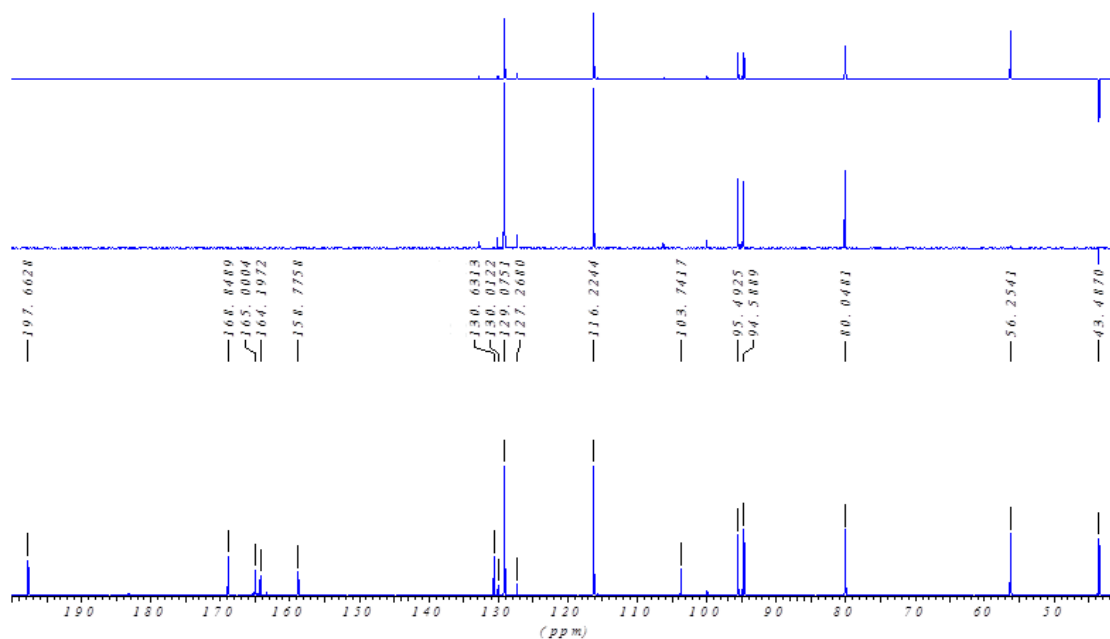


Figura 33 - Espectro de ^{13}C -RMN da Pinocembrina (4).

SS 0936 Al AL 545

Figura 34 - Espectro de ^1H -RMN da Sakuranetina (5).Figura 35 - Espectro de ^{13}C -RMN da Sakuranetina (5).

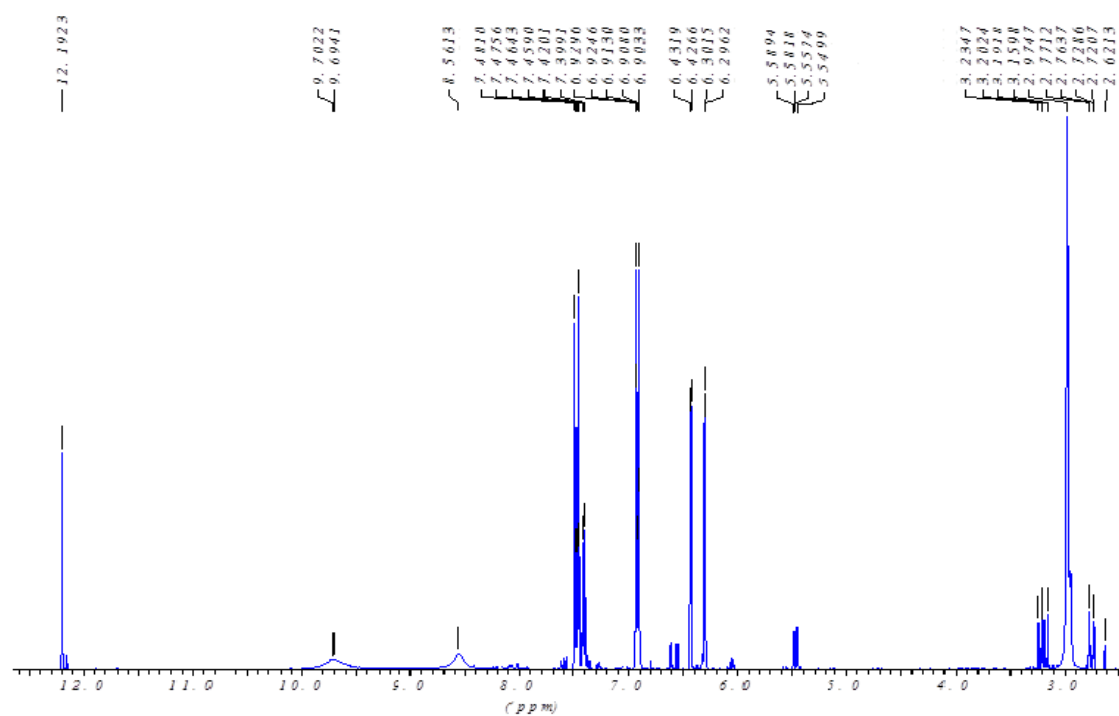


Figura 36 - Espectro de ^1H -RMN da Naringenina (6).

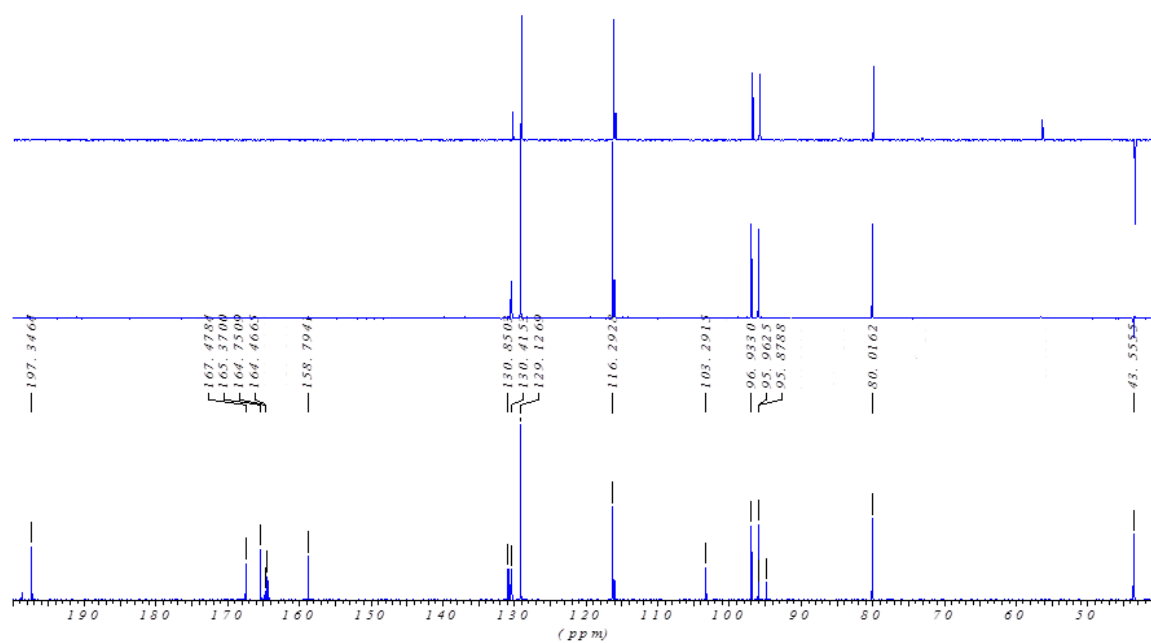


Figura 37 - Espectro de ^{13}C -RMN da Naringenina (6).

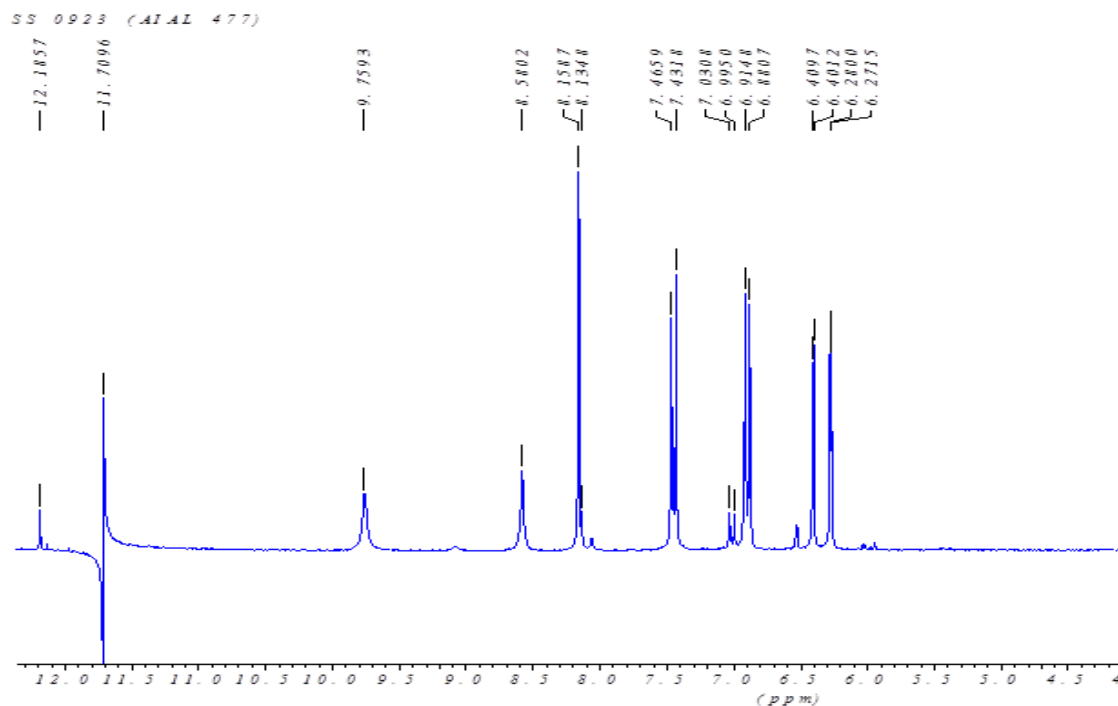


Figura 38 - Espectro de ^1H -RMN da Genisteína (7).

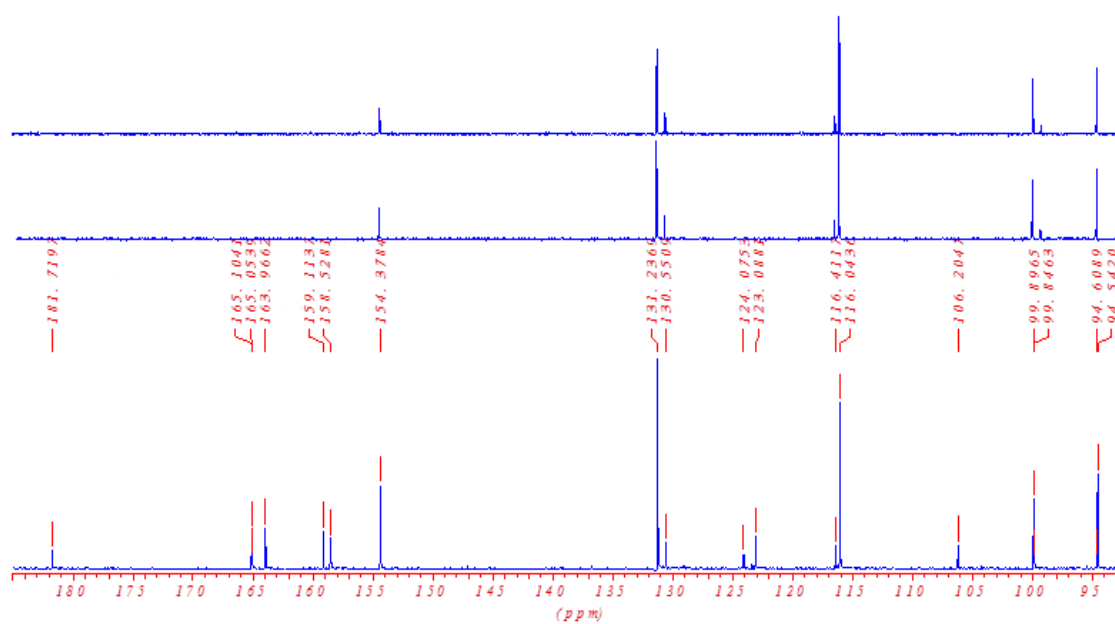


Figura 39 - Espectro de ^{13}C -RMN da Genisteína (7).

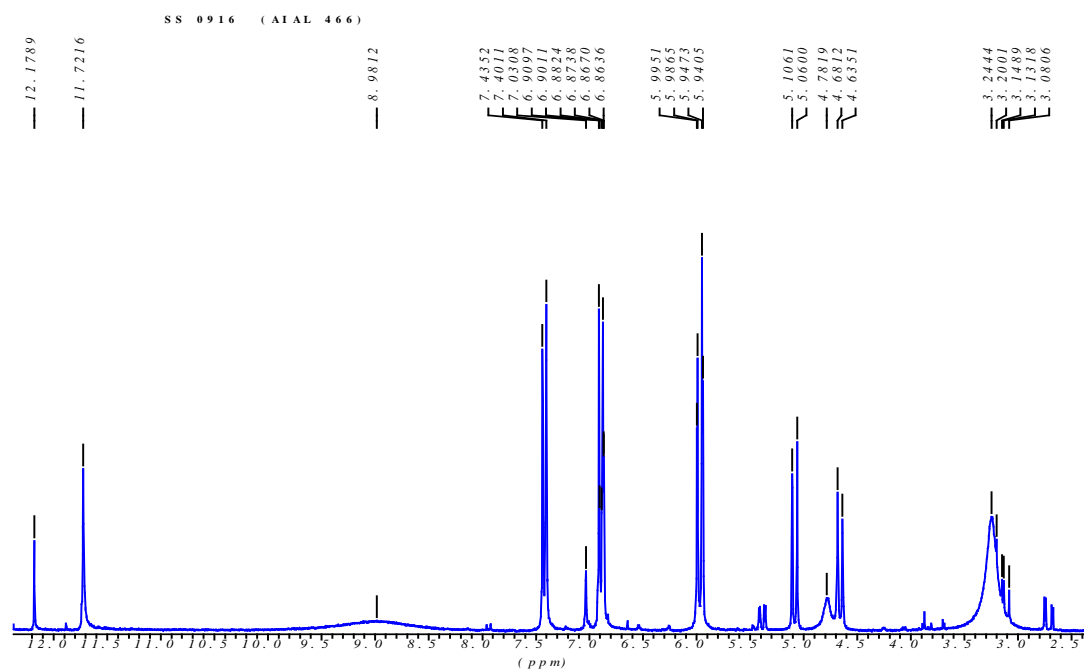


Figura 40 - Espectro de ^1H -RMN do Dihidrocanferol (8).

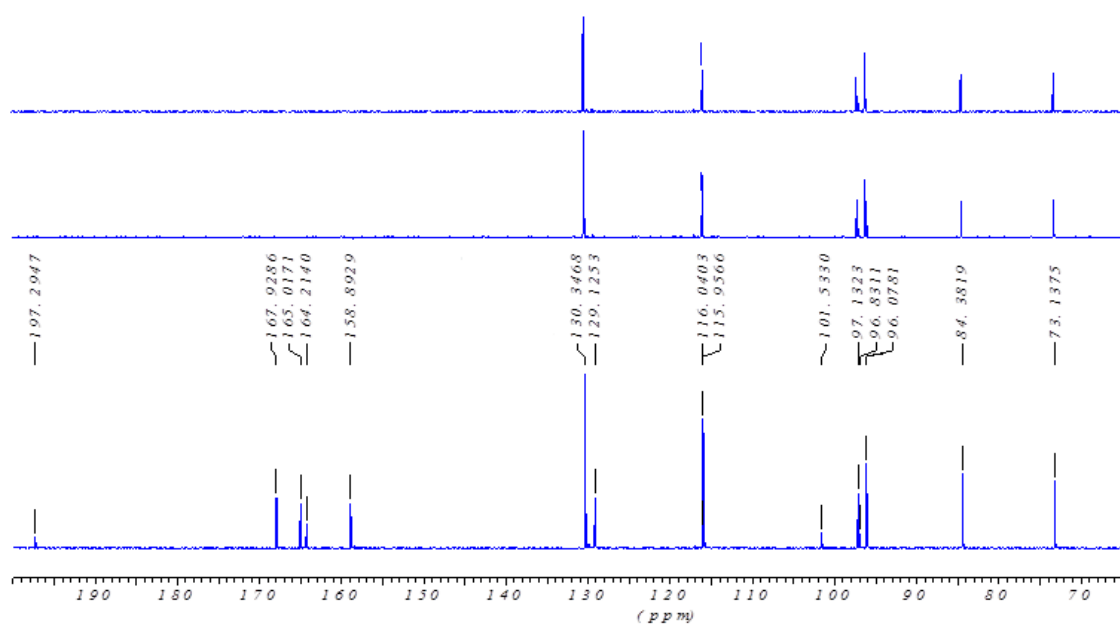


Figura 41 - Espectro de ^{13}C -RMN do Dihidrocanferol (8).

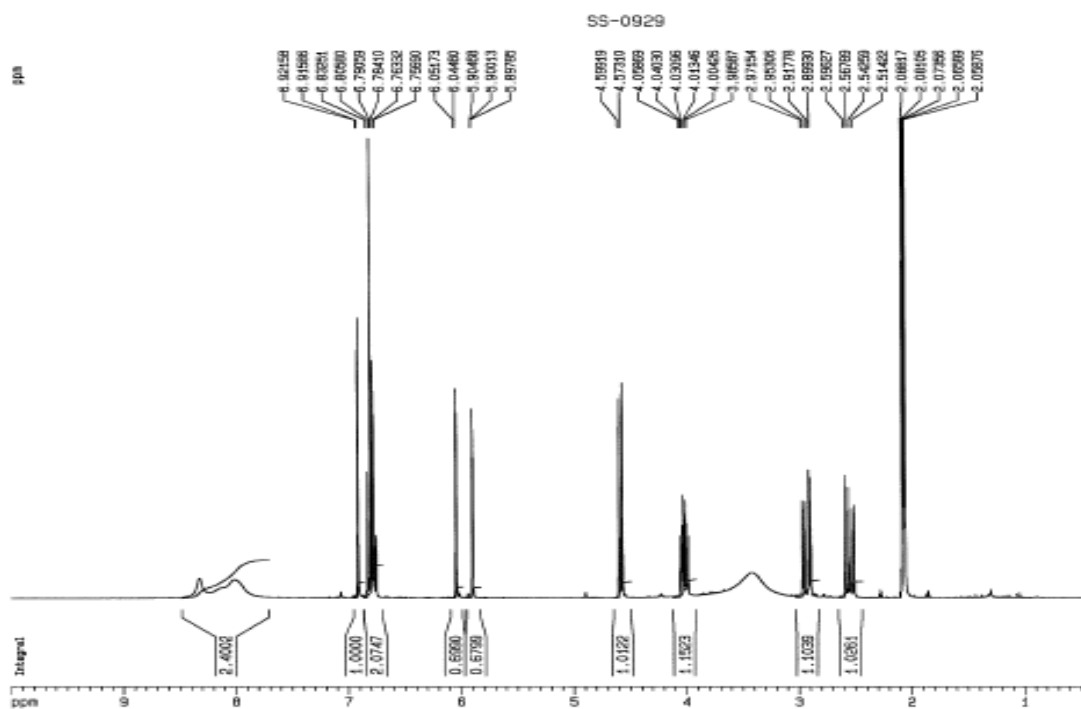


Figura 42 - Espectro de ^1H -RMN da Catequina (9).

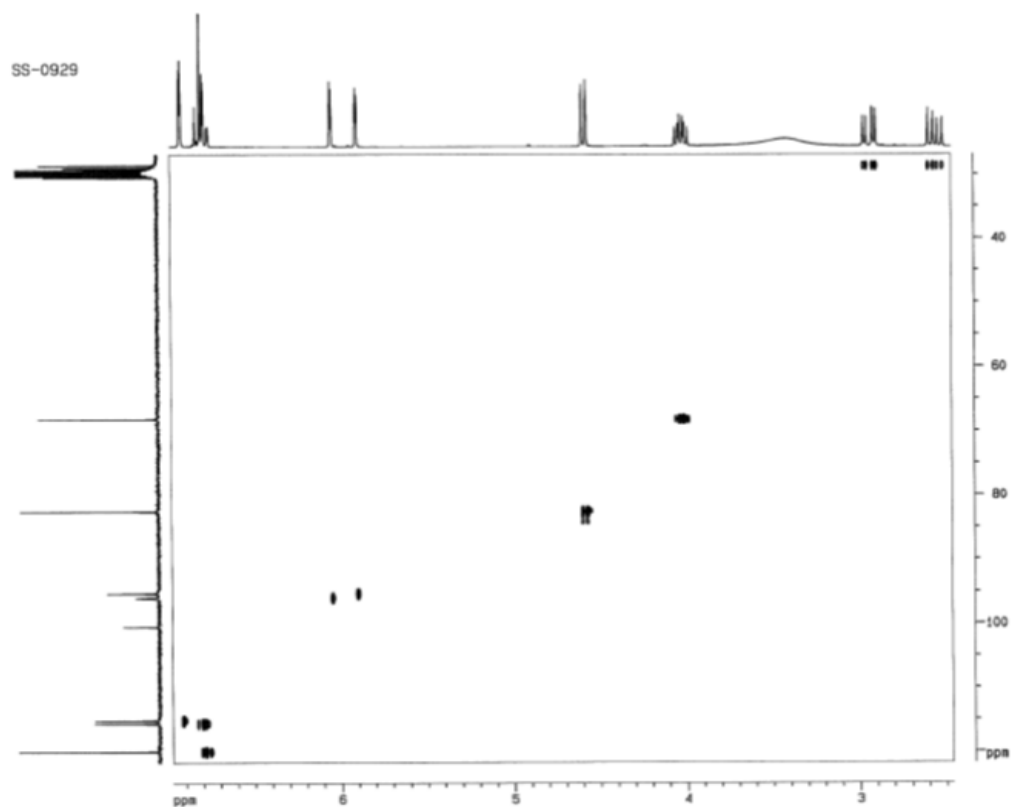
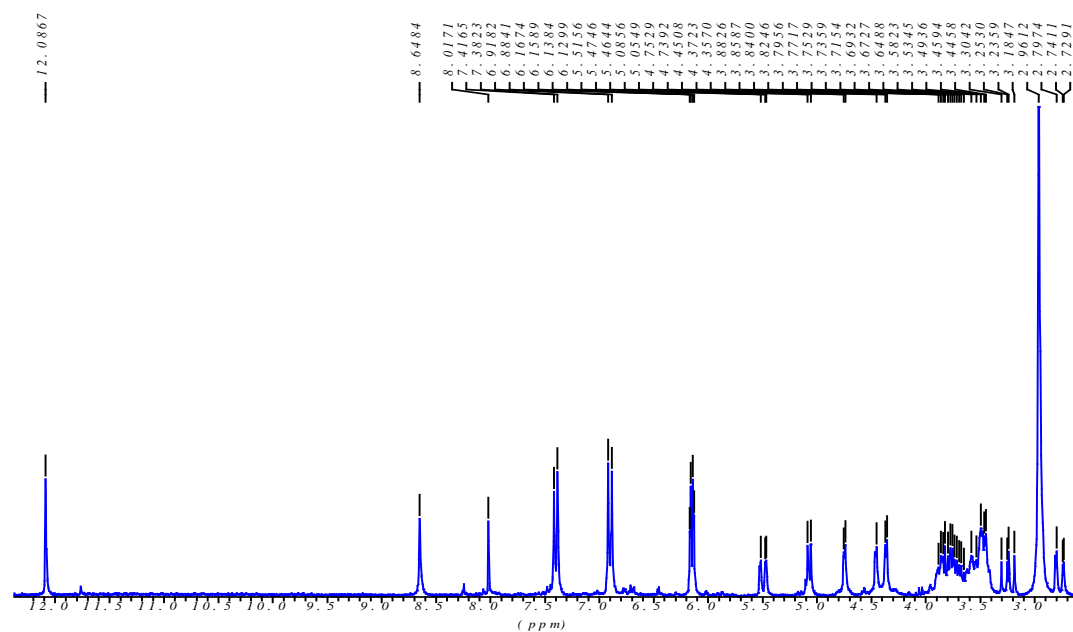
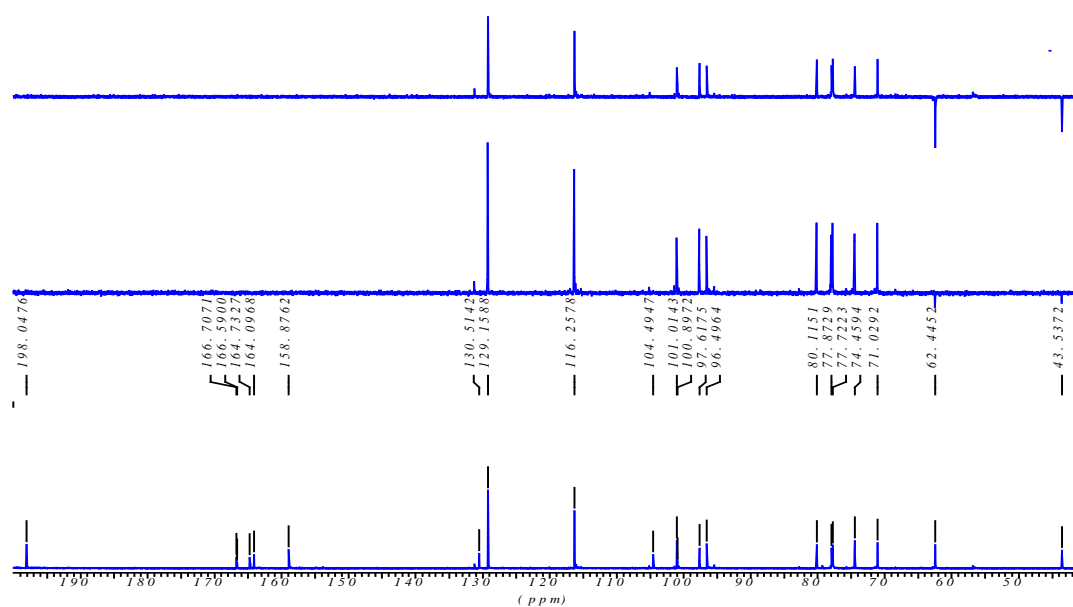


Figura 43 - Espectro de RMN-2D da Catequina (9).

SS 0930 A1 A1 529

Figura 44 - Espectro de ¹H-RMN da Prunina (10).

SS 0930 A1 AL 540

Figura 45 - Espectro de ¹³C-RMN da Prunina (10).

ANEXO II

REPRESENTAÇÕES GRÁFICAS

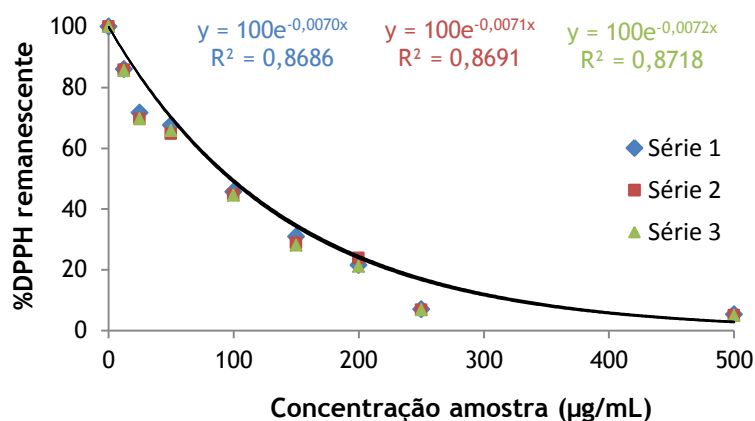


Figura 46 - Representação gráfica da percentagem de DPPH remanescente em função das diferentes concentrações testadas do extracto da madeira de cerejeira (Série 1, 2 e 3).

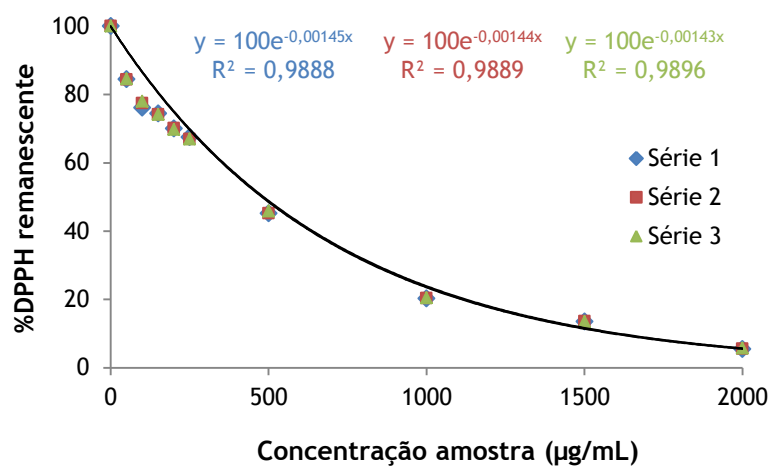


Figura 47 - Representação gráfica da percentagem de DPPH remanescente em função das diferentes concentrações testadas da Fracção I do extracto da madeira de cerejeira (Série 1, 2 e 3).

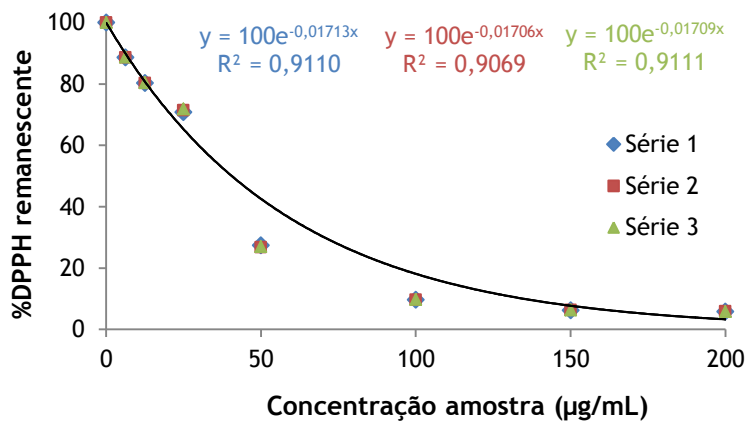


Figura 48 - Representação gráfica da percentagem de DPPH remanescente em função das diferentes concentrações testadas da Fracção II do extracto da madeira de cerejeira (Série 1, 2 e 3).

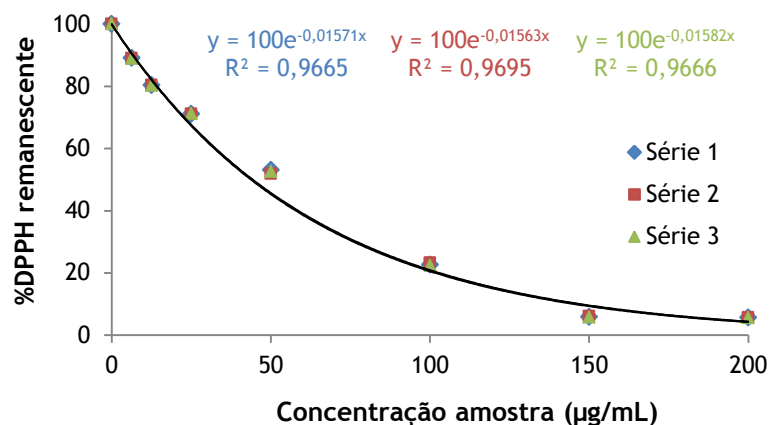


Figura 49 - Representação gráfica da percentagem de DPPH remanescente em função das diferentes concentrações testadas da Fracção III do extracto da madeira de cerejeira (Série 1, 2 e 3).

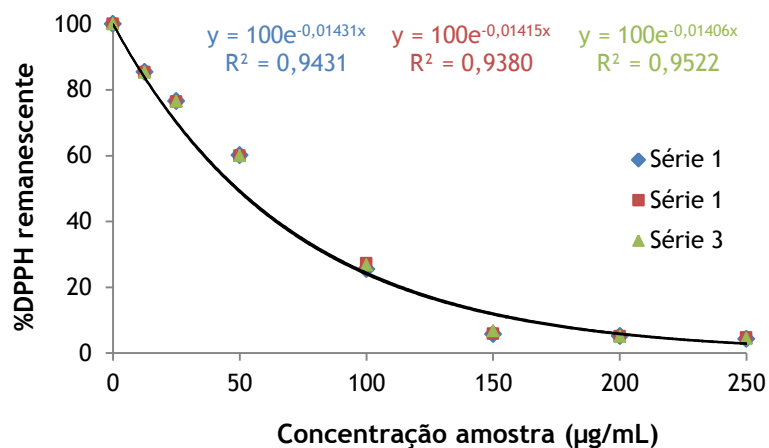


Figura 50 - Representação gráfica da percentagem de DPPH remanescente em função das diferentes concentrações testadas do extracto dos pés de cereja (Série 1, 2 e 3).

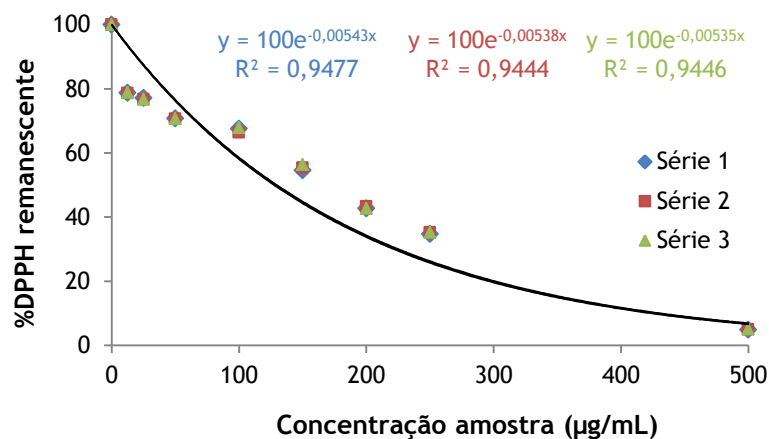


Figura 51 - Representação gráfica da percentagem de DPPH remanescente em função das diferentes concentrações testadas do extracto da casca da madeira de cerejeira (Série 1, 2 e 3).

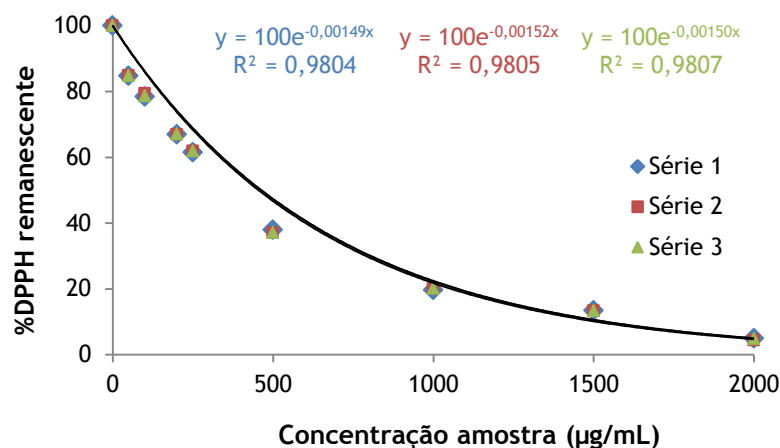


Figura 52 - Representação gráfica da percentagem de DPPH remanescente em função das diferentes concentrações testadas do extracto das folhas de cerejeira (Série 1, 2 e 3).

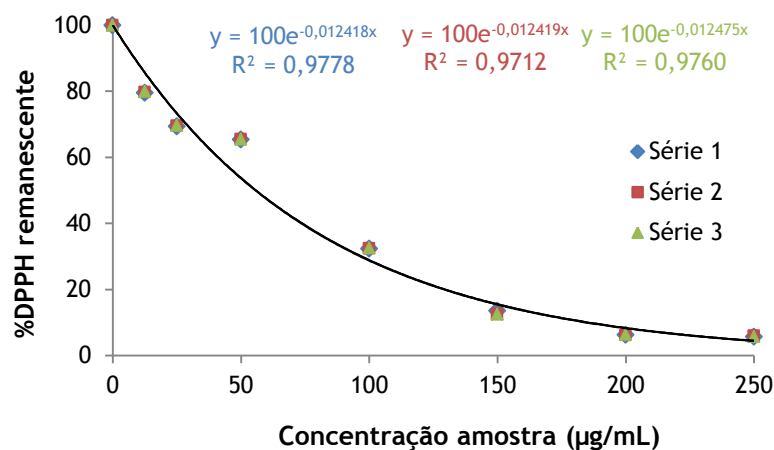


Figura 53 - Representação gráfica da percentagem de DPPH remanescente em função das diferentes concentrações testadas do extracto a frio com AcOEt da madeira de cerejeira (Série 1, 2 e 3).

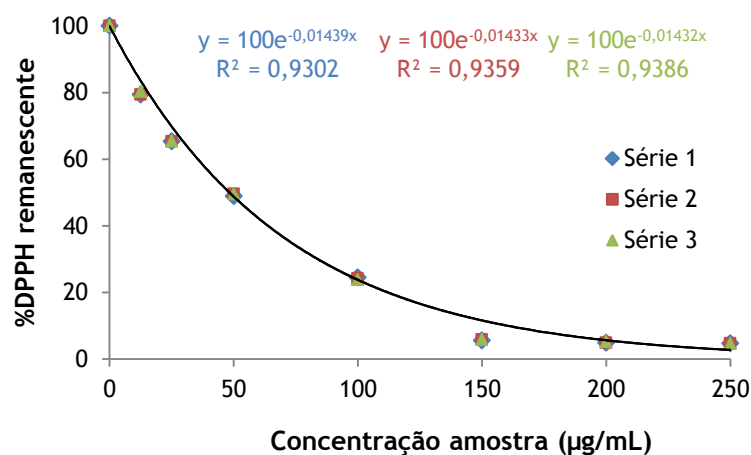


Figura 54 - Representação gráfica da percentagem de DPPH remanescente em função das diferentes concentrações testadas do extracto a frio com Acetona da madeira de cerejeira (Série 1, 2 e 3).

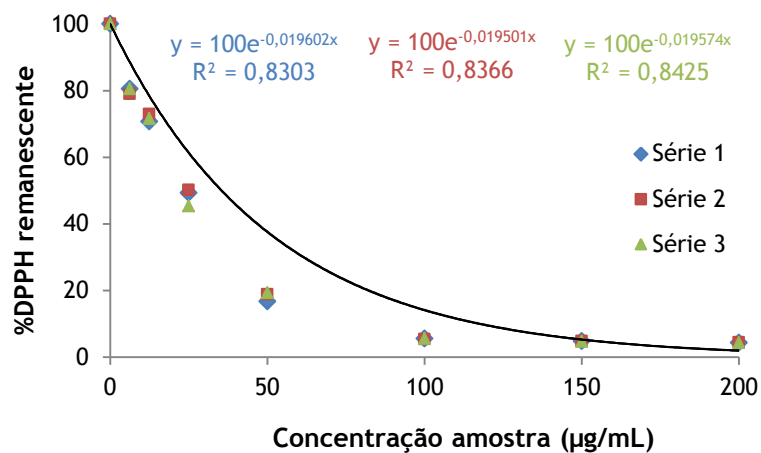


Figura 55 - Representação gráfica da porcentagem de DPPH remanescente em função das diferentes concentrações testadas da catequina (Série 1, 2 e 3).

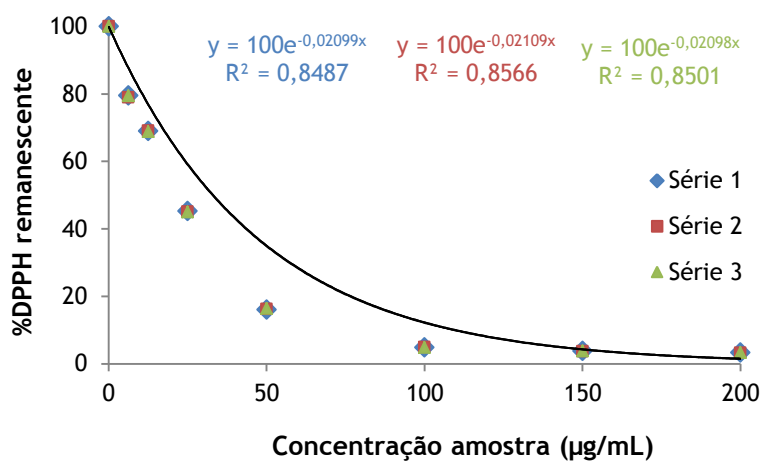


Figura 56 - Representação gráfica da porcentagem de DPPH remanescente em função das diferentes concentrações testadas da quercetina (Série 1, 2 e 3).